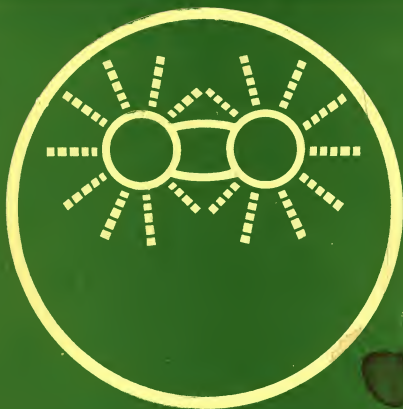


ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ



ИММУНОГЕНЕЗ
И КЛЕТОЧНАЯ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

К1755555

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Научный совет по проблеме
«ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЖИВОТНЫХ
И УПРАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССАМИ ОНТОГЕНЕЗА»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н. К. КОЛЬЦОВА

ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

ИММУНОГЕНЕЗ И КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

МОСКВА

1978

1741/59

УДК 576.8.097+591.39

Иммуногенез и клеточная дифференцировка. М., «Наука», 1978, 232 с. Авт.: А. Е. Гурвич, И. К. Егоров, А. И. Кяйвярйнен и др.

В книгу вошли обзоры по узловым проблемам иммунологии: онтогенез лимфоидной ткани, ее клональная структура, отдельные типы лимфоидных клеток, клеточные взаимодействия при индукции и развитии иммунного процесса, строение антител и иммуноглобулинов, биосинтез антител и иммуноглобулинов, генетика иммуноглобулинов и гистосовместимости. Издание рассчитано на иммунологов, гистологов, генетиков. Табл. 13, ил. 42, список лит. 823 назв.

Авторы

*А. Е. Гурвич, И. К. Егоров, А. И. Кяйвярйнен,
Е. А. Лурия, А. А. Михайлова, Р. С. Незлин,
Р. В. Петров, О. В. Рохлин, Е. В. Сидорова, А. Я. Фриденштейн,
И. Л. Чертков*

Редакционная коллегия серии «Проблемы биологии развития»

*М. С. Мицкевич (главный редактор),
Т. А. Детлаф (зам. главного редактора),
В. Я. Бродский, С. Г. Васецкий, А. Е. Гайсинович,
А. П. Дыбан, Г. В. Лопашов, А. А. Нейфах,
Б. П. Токин, Т. М. Турпаев, Н. Г. Хрущов*

Ответственный редактор

доктор биологических наук *А. Е. Гурвич*

555555
1755551
X

ПОГАСЕНО

Государственная
публичная библиотека
им. А. Г. Беллинского
г. Свердловск

ВВЕДЕНИЕ

Организм высших животных способен очень тонко оценивать особенности строения присутствующих в нем макромолекул (белков, полисахаридов, липидов). Уловив появление новых макромолекул (антигенов), организм «запоминает» это событие и отвечает на него цепью последовательных реакций. Все эти процессы осуществляются иммунной системой, связанной с деятельностью лимфатических клеток. Последние образуют функционально единую систему, несмотря на то что они разбросаны по всему организму в виде одиночных клеток или скоплений (лимфатические узлы, селезенка, тимус) и характеризуются большой гетерогенностью. Изучение дифференцировки лимфатических клеток дает уникальные возможности для выяснения молекулярных основ явления дифференцировки вообще.

Дифференцировка лимфоцитов осуществляется в два этапа: во время эмбриогенеза и во взрослом состоянии, при развитии иммунного процесса. Эти возможности обусловлены исключительным разнообразием белков, синтезируемых разными лимфатическими клетками, хорошей изученностью строения этих белков и возможностью их точной идентификации. Именно успехи в этой области заложили основы для глубокого и последовательного анализа дифференцировки лимфатических клеток. Это представляет особый интерес для специалистов в области биологии развития.

К началу быстрого роста знаний в области иммунологии (1959 г.) было известно следующее.

1. Многие вещества (белки, полисахариды, липиды), введенные в организм, вызывают в нем перестройку в одном из двух направлений: положительную иммунную реакцию, приводящую к появлению (резкому увеличению количества?) белковых молекул (антител) или иммунных лимфоцитов, специфически реагирующих с введенным веществом — антигеном (иммуногеном), или негативную иммунную реакцию (толерантность), в результате которой становится невозможным индуцировать образование антител и иммунных лимфоцитов против вещества, вызвавшего толерантность (толерогена), хотя они образуются против других веществ.

2. Антитела относятся к группе сывороточных белков, относительно медленно мигрирующих при электрофорезе (гамма-глобулины, или иммуноглобулины). Не все молекулы иммуноглобулинов обладают выявляемой активностью антитела (неспецифические иммуноглобулины).

3. Активный центр антитела невелик, и оно реагирует не со всей макромолекулой антигена, но лишь с небольшим ее участком (с антигеной детерминантой) или с небольшим химическим радикалом (гэпеном), присоединенным к макромолекуле.

4. Иммунные реакции характеризуются большой специфичностью и чувствительностью; они позволяют уловить очень тонкие различия

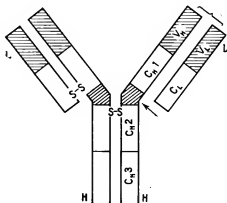


Рис. 1. Строение молекулы иммуноглобулина (IgG)

Молекула состоит из четырех полипептидных цепей: двух легких (L) и двух тяжелых (H). Полипептидные цепи можно разбить на участки (домены) из 100—110 аминокислотных остатков с одной внутрицепочечной петлей. Каждая полипептидная цепь содержит две сильно различающиеся области: переменную (V) и константную (C). V-области, как в H- так и в L-цепях равны по величине одному домену. В L-цепях C-область также состоит из одного домена. C-область H-цепей образована тремя доменами (C_H^1 , C_H^2 , C_H^3) и небольшим «шарнирным» участком (стрелка). В построении активного центра антитела принимают участие V-области как H-цепи, так и L-цепи. Место связывания антигена показано фигурной скобкой

между сравниваемыми антигенами, например, различия, связанные с перемещением радикала всего лишь на 1,5 Å или с заменой в молекуле белка одного из 1000 аминокислотных остатков.

Наибольшее значение для дальнейшего бурного развития иммунологических исследований и изучения строения антител (иммуноглобулинов) имели два обстоятельства. Во-первых, обнаружение Эдельманом того, что каждая молекула иммуноглобулина состоит из нескольких полипептидных цепей и, во-вторых, положение Бернета о том, что каждый вариант молекул иммуноглобулина образуется отдельной популяцией (кломом) клеток, имеющих общее происхождение.

В связи с этим в качестве материала исследования стали использовать чрезвычайно гомогенные «патологические» иммуноглобулины, которые обнаруживаются в моче и крови некоторых больных, имеющих опухоли, развившиеся из одной лимфатической клетки (см. раздел I.1).

В результате этих исследований было показано, что каждая молекула иммуноглобулина состоит из двух типов полипептидных цепей (рис. 1): «легких» L (примерно 210 аминокислотных остатков, м. в. 22 500) и «тяжелых» H (разные варианты содержат 450 или 560 аминокислотных остатков, м. в. 50 000 или 70 000, см. разделы I, II, V).

Оказалось, что в крови человека присутствует 10 классов и подклассов молекул иммуноглобулина, различающихся по H-цепям, входящим в их состав (табл. 1). По L-цепям, входящим в состав молекул иммуноглобулинов, эти молекулы можно подразделить на три типа. Все H- и

Таблица 1

Разные варианты иммуноглобулинов человека

Класс	IgG				IgM		IgA		IgD	IgE
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM1	IgM2	IgA1	IgA2		
Подкласс										
H-цепи, входящие в молекулу	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\mu 1$	$\mu 2$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	δ	ϵ
L-цепи, входящие в молекулу					λ , $\lambda_{\text{арг}}$, $\lambda_{\text{лиз}}$					
Формула молекулы	H_2L_2				$(H_2L_2)_5$		H_2L_2			

L-цепи, входящие в состав данной молекулы, идентичны друг другу. Благодаря тому что H-цепь любого из 10 классов может образовывать молекулы, соединившись с L-цепью любого из трех типов, число вариантов молекул иммуноглобулинов достигает 30. Сходные классы и типы иммуноглобулинов обнаружены и у ряда животных.

Особенно неожиданные результаты были получены при изучении расположения аминокислотных остатков в полипептидных цепях различных иммуноглобулинов. Оказалось, что каждую такую цепь можно подразделить на две резко различающиеся области: вариабельную (V) и константную, или постоянную (C).

C-области идентичны у всех молекул иммуноглобулинов данного варианта, именно строение этих областей определяет принадлежность полипептидной цепи к определенному классу, подклассу или типу.

Как правило, строение каждой изученной V-области частично отличается от строения всех других. Это обусловлено тем, что в V-областях наряду с неварьирующими участками имеются участки, в которых аминокислотные замены часты. Вариабельность стала привлекать особое внимание после того, как было показано, что именно те участки (гипервариабельные), где она выражена сильнее всего, играют наибольшую роль в построении активного центра антитела (см. раздел I).

После того как строение V-областей было изучено в десятках полипептидных цепей, стало возможным объединить их в более или менее сходные по строению группы и подгруппы V-областей. Так, были выявлены четыре подгруппы вариабельных областей — V_{H1} — V_{H4} , каждая из которых может соединяться с константной областью тяжелой цепи любого класса. Пять других подгрупп вариабельных областей V_{L1} — V_{L5} могут соединяться обеими константными областями λ -цепей (λ_{arg} и λ_{haz}). И, наконец, каждая из трех других подгрупп вариабельной области V_{H1} — V_{H3} может соединяться с константной областью κ -цепи (см. разделы I, II, V).

Объяснение столь необычного для белковой химии явления, как построение одной полипептидной цепи из двух совершенно разных областей (V и C) и возможность их объединения в одной цепи в разных комбинациях, требовало новых подходов. Было высказано предположение, что концепция «один ген — одна полипептидная цепь» неверна для иммуноглобулинов и что у них V- и C-области одной цепи контролируются двумя различными генами (см. разделы II, V).

Это предположение было подтверждено генетическими исследованиями, которые стали возможны после того, как было показано, что, помимо упомянутых выше вариантов иммуноглобулинов, присутствующих у всех людей (или у всех особей данного вида), удается выявить и варианты, которые имеются лишь у некоторых. Эти так называемые аллотипические варианты иммуноглобулинов наследуются по законам Менделя и содержат антигенные детерминанты («генетические метки»), выявляемые иммунологическими методами. Так, у человека в γ -цепях установлено 20 таких меток, в α_2 -цепи — две метки и в κ -цепи — четыре метки. Поскольку каждой метке соответствует определенный ген, стало возможным изучить комплекс генов, контролирующих строение иммуноглобулинов у людей и различных животных, проследить эволюцию этих генов. Была показана независимость группы генов, контролирующих H- и L-цепи. Более чем для половины генетических меток иммуноглобулинов человека установлено, в какой полипептидной цепи и в каком именно ее

участке они локализованы. В результате таких исследований, в частности, были выявлены генетические метки как в С-, так и в V-областях. Благодаря этому стало возможно изучать генетический контроль каждой из этих областей и показать, что действительно каждая из них контролируется независимым геном (см. раздел II).

Результаты биохимических и генетических исследований поставили перед иммунологами многочисленные вопросы, для решения которых было необходимо изучить морфологию, генетику и обмен лимфатических клеток.

Быстрый прогресс клеточной иммунологии был связан с использованием иммунологических методов. Особую роль сыграло применение меченых антител, каждое из которых реагирует с одним из вариантов H- или L-цепей или с каким-либо иным антигеном. Пометив такое антитело радиоактивным соединением (например, ^3H , ^{125}I) или флуоресцирующим красителем и обработав ими препараты (мазки или срезы) лимфатических клеток, можно с полной определенностью выявить клетки, секретирующие или содержащие на поверхности тот или иной антиген, например антиген μ -цепи иммуноглобулинов.

Большую роль сыграло также использование микрометодов, позволяющих определять синтез антител одиночными клетками. Для этой цели обычно используют либо культивирование лимфатических клеток в микрокаплях, либо выявление антителообразующих клеток методом локального гемолиза (метод Эрне). Метод Эрне состоит в следующем: эритроциты смешивают с суспензией лимфатических клеток, содержащей клетки, образующие антитела против этих эритроцитов; смесь помещают в слой агарового геля и инкубируют некоторое время. Антитела против эритроцитов, синтезированные антителообразующими клетками, секретируются в окружающую среду, присоединяются к близлежащим эритроцитам и (при наличии комплемента) лизируют их. Благодаря этому вокруг каждой антителообразующей клетки образуется зона просветления («плак»). Этот метод можно приспособить для выявления антител не только против эритроцитов, но и против любого другого антигена, покрыв им поверхность эритроцитов, используемых для проведения реакции.

При помощи метода Эрне можно определить не только специфичность синтезируемого антитела, но и то, к какому классу, типу или аллотипу оно относится (например, IgM- или IgA-антитела). Для этого достаточно добавить к смеси клеток с эритроцитами антисыворотку к соответствующему иммуноглобулину. Если секретируемое антителообразующей клеткой антитело реагирует с добавленной антисывороткой, то плаки не образуются.

В результате подобных исследований было показано, что лимфоциты делятся на две большие группы: В-лимфоциты (тимуснезависимые), которые синтезируют и секретируют антитела (иммуноглобулины), и Т-лимфоциты (тимусзависимые), играющие большую роль в регуляции функции В-лимфоцитов и участвующие в развитии ряда иммунологических процессов (явление клеточного иммунитета), не связанных с образованием антител. Каждая из групп в свою очередь распадается на множество подгрупп.

После установления чрезвычайной гетерогенности как белков, синтезируемых лимфатическими клетками, так и самой популяции этих клеток, основным направлением исследований в иммунологии стало изуче-

ние дифференцировки лимфатических клеток, регуляции иммунных процессов и генетического контролирования их.

Исследование этих процессов можно подразделить на два этапа. Первый этап, по-видимому, не зависит от присутствия антигена, и в основном протекает во время эмбриогенеза. Основным смысл дифференцировки В-лимфоцитов состоит в том, чтобы из всех генов семейства иммуноглобулинов в данной клетке сохранила активность лишь небольшая их часть, а в другой клетке — другая часть (фенотипическое ограничение). Во всем же организме, несмотря на дифференцировку отдельных клеток, сохраняется активность всех генов семейства иммуноглобулинов и секретируются молекулы, содержащие всевозможное сочетание продуктов этих генов (см. раздел V).

Сходно регулируется активность и аллельных генов. У гетерозиготного животного синтезируются иммуноглобулины, контролируемые обоими аллельными генами, но в каждой лимфатической клетке работает лишь один из них (аллельное исключение) (см. разделы II, V).

Возможность сочетания продуктов разных генов иммуноглобулинов в одной молекуле связана, во-первых, с тем, что активность генов, контролирующих H- и L-цепи, регулируется независимо. Еще большее значение имеет второй, ранее неизвестный в молекулярной биологии процесс, который приводит к соединению в одной полипептидной цепи, как об этом упоминалось выше, продуктов варибельного и константного генов.

Механизм этого процесса до настоящего времени не выяснен. Удалось лишь установить, что полипептидная цепь синтезируется как одно целое, а не соединением самостоятельно образовавшихся V- и C-областей. Было показано также, что синтез каждой цепи контролируется одной молекулой информационной РНК (см. раздел III). Из этих данных можно сделать вывод, что V- и C-гены объединяются в нити ДНК. Изучение этого процесса показало, что на ранних стадиях онтогенеза V- и C-гены локализованы в этой нити на большом расстоянии друг от друга, но к концу эмбриогенеза они оказываются рядом (см. разделы II, III).

Образование новых связей между V- и C-генами может, по-видимому, происходить и во взрослом организме в процессе развития клона при переклещении клеток с синтеза одного иммуноглобулина на синтез другого (например, с синтеза μ -цепей на синтез γ -цепей). В некоторых случаях переключение происходит таким образом, что клетки начинают синтезировать новую C-область, не меняя синтеза V-области. В результате этого процесса начинают образовываться полипептидные цепи с новым сочетанием продуктов этих генов (см. раздел V).

Наиболее интересным процессом первого этапа дифференцировки является процесс образования клонов предшественников антителообразующих клеток (ПАОК). Клетки каждого из этих клонов содержат на своей поверхности рецепторы, способные реагировать с определенным антигеном и превращаться в клетки, синтезирующие и секретирующие антитела против этого антигена (антителообразующие клетки) (см. разделы IV, VI).

Очень принципиален вопрос о числе клонов антителообразующих клеток. Согласно клональной теории, оно должно быть равно числу различающихся по специфичности антител, поскольку каждое из них синтезируется в отдельном клоне. К сожалению, до настоящего времени нет возможности ответить на этот вопрос. Согласно мнению ряда ученых,

число различающихся по специфичности антител колеблется от 10^4 до 10^{12} . Большинство исследователей признает сейчас, что оно равно (или больше) 10^7 , и, следовательно, в организме должно существовать не менее 10^7 клонов. И, действительно, у взрослых мышей удалось выявить именно такое число (10^7) клонов. Интересно отметить, что часть из них (10^4) образуется во время онтогенеза, а остальные образуются в последующий период.

Дифференцировка Т-клеток, протекающая в этот же период, связана с миграцией лимфоцитов в тимус и временным пребыванием их там. Поскольку природа рецепторов Т-клеток до конца не ясна, о дифференцировке этих клеток приходится судить либо по их функции, либо по поверхностным маркерам (например, по Ly-маркерам).

Второй этап регуляции иммунных процессов обусловлен действием антигена (иммуногена). В этот период происходит превращение предшественников антителообразующих клеток в антителообразующие клетки и последующее развитие образовавшегося клона. Хотя это развитие и связано с морфологическими изменениями, но наиболее характерна для него резкая и избирательная стимуляция пролиферации клона клеток, реагировавших с использовавшимся антигеном.

Возможность вызвать этот процесс по желанию экспериментатора и изучать его в строго контролируемых условиях обусловила быстрый прогресс в этой области. Индукция иммунного процесса оказалась значительно более сложным процессом, чем этого можно было ожидать. В большинстве случаев она связана не только с действием антигена, но и с взаимодействиями как между клетками разного типа (макрофаги, В- и Т-лимфоциты, А-клетки), так и между клетками, относящимися к одному типу (см. раздел VII). В межклеточных взаимодействиях принимают участие многочисленные рецепторы на поверхности Т- и В-лимфоцитов и десятки гуморальных факторов, вырабатываемых этими клетками. Так нарастание числа В-лимфоцитов зависит как от действия Т-лимфоцитов-помощников (хелперов), стимулирующих их пролиферацию, так и от действия Т-лимфоцитов-супрессоров, ингибирующих этот процесс. Т-супрессоры и Т-хелперы отличаются друг от друга не только функционально, но и по поверхностным маркерам (например, $Ly1^{-}2^{+}3^{+}$ — у первых и $Ly1^{+}2^{-}3^{-}$ — у вторых).

В отличие от двух упомянутых выше подгрупп Т-лимфоцитов третья их подгруппа (Т-киллеры, или убийцы) играет более самостоятельную роль, осуществляя реакции клеточного иммунитета.

Важное значение сыграло установление того факта, что протекание многих иммунных процессов связано с главным комплексом генов тканевой совместимости. Этот комплекс генов контролирует строение антигенов тканевой совместимости — гликопротеидов, локализованных на поверхности не только лимфатических, но и других клеток. Сначала главный комплекс генов тканевой совместимости интересовал иммунологов потому, что именно контролируемые им антигены вызывали иммунологическую реакцию, приводящую к отторжению ткани, пересаженной от генетически неидентичной особи того же вида. В дальнейшем оказалось, что в области этого комплекса помимо генов, контролирующих трансплантационные антигены, лежат и другие гены, играющие существенную роль в развитии иммунологических процессов. Изучены две группы таких генов: Ir (immune response) и гены I-области. У мышей Ir-гены локализованы в трех субобластях главного комплекса и опреде-

ляют активность иммунного ответа на многие антигены. I-гены удалось выявить в пяти подгруппах главного комплекса. Они контролируют строение Ia-антигенов, обнаруживаемых как на поверхности клеток, так и в составе гуморальных факторов, секретируемых Т-хелперами и Т-супрессорами (см. раздел VIII).

Связь между генами, контролирующими строение иммуноглобулинов и трансплантационных антигенов, была выявлена и при исследованиях, проводившихся в другом направлении. Оказалось, что одна из полипептидных цепей (β_2 -микроглобулин), входящих в состав молекулы трансплантационного антигена, гомологична по строению полипептидным цепям иммуноглобулинов.

Изучение иммунологических процессов позволило подойти к постановке и решению ряда узловых вопросов молекулярной и общей биологии. Здесь очень ярко проявляются исключительные возможности регулирующих механизмов организма, а также наличие мощных механизмов, тормозящих синтез определенных белков и пролиферацию отдельных клонов клеток. Несмотря на дифференцировку клеток и переход их на синтез ограниченного числа белков, организм в целом сохраняет способность синтезировать огромное число белков. Это связано с клональным характером дифференцировки и возможностью объединять в разных сочетаниях в одной молекуле и в одной полипептидной цепи продукты разных генов.

По-видимому, наиболее перспективно изучение двух ранее неизвестных процессов, механизма возникновения вариабельности и путей объединения в одной полипептидной цепи продуктов двух генов.

Не менее перспективно изучение сложнейшей регуляции пролиферации лимфатических клеток. В этом процессе принимают участие целый набор специализированных «регулирующих» клеток и продукты многочисленных генов.

А. Е. Гурвич

СТРУКТУРА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

1.1. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О СТРОЕНИИ АНТИТЕЛ

1.1.1. Классы иммуноглобулинов

В настоящее время антитела и некоторые близкие к ним белки относят к особой группе гликопротеидов, называемых иммуноглобулинами. Всем им присущ ряд общих черт: близкие антигенные и химические свойства, одинаковые принципы построения молекул и общее филогенетическое происхождение. По-видимому, все иммуноглобулины — как «нормальные», так и «патологические», встречающиеся в повышенном количестве при некоторых пролиферативных заболеваниях лимфатической системы, — являются антителами к каким-либо антигенам (Незлин, 1971, 1972; Gally, 1973; Nisonoff et al., 1975).

Молекулы иммуноглобулинов, как уже отмечалось во Введении, строятся из «тяжелых» и «легких» полипептидных цепей (рис. 2). Классы иммуноглобулинов отличаются друг от друга своими тяжелыми цепями. У человека насчитывается пять классов этих белков (IgG, IgM, IgA, IgD и IgE), тяжелые цепи которых обозначают соответственно греческими буквами γ , μ , α , δ и ϵ . Легкие цепи молекулы иммуноглобулинов человека и большинства животных бывают двух типов: каппа и ламбда. Оба типа легких цепей могут входить в состав молекул всех классов иммуноглобулинов. Молекулы IgM и полимерные молекулы IgA содержат, кроме того, по одной J-цепи, а полимерные IgA — еще и так называемый секреторный компонент.

Обычно большая часть антител относится к классу IgG. В первый период иммунного ответа, однако, значительная часть антител принадлежит к IgM, которые являются, по-видимому, филогенетически наиболее древними. IgA обладают свойством проникать в секреты — слюну, молоко, кишечный сок и др. Антитела типа реагинов относятся к IgE.

1.1.2. Первичная структура пептидных цепей иммуноглобулинов

Выяснение последовательности аминокислот в пептидных цепях иммуноглобулинов затруднено гетерогенностью этих белков. Антитела к данному антигену, выделенные даже в чистом виде, почти всегда неоднородны. Одной из причин этой неоднородности следует прежде всего называть наличие у большинства антигенов нескольких антигенных детерминант, к которым образуются различные по специфичности антитела. Кроме того, антитела даже к одной детерминанте могут принадлежать

к разным классам и подклассам иммуноглобулинов. Далее следует упомянуть и о том, что в ходе иммунного ответа могут меняться свойства самих антител.

Возможность изучения химической структуры иммуноглобулинов появилась после обнаружения так называемых патологических иммуноглобулинов, встречающихся при некоторых лимфопролиферативных заболеваниях у человека и животных. Эти иммуноглобулины очень сходны с нормальными, но отличаются от них гомогенностью. В последнее время проводятся исследования по получению однородных антител путем иммунизации гомогенными антигенами. В ряде случаев удалось выработать достаточно большие количества гомогенных препаратов, пригодных для определения последовательности аминокислотных остатков в их полипептидных цепях.

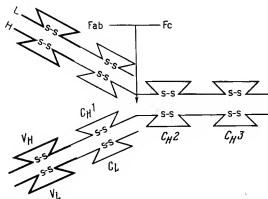
Начиная с 1965 г. была проделана большая работа по расшифровке первичной структуры пептидных цепей иммуноглобулинов (см. обзоры: Незлин, 1972; Nisonoff *et al.*, 1975), которая в 1969 г. ознаменовалась крупным успехом: группой Эдельмана была установлена полная последовательность аминокислот в обеих цепях одного иммуноглобулина (IgG 1Eu) (Edelman, 1973).

Наиболее важным результатом этих исследований явилось обнаружение у тяжелых и легких цепей двух резко различных областей (см. рис. 2) — вариабельной (V) и постоянной (C). Цепи данного класса (подкласса) и типа различаются только по последовательности V-областей (идиотипические вариации), тогда как C-области у них идентичны, за исключением небольших отличий, обуславливающих аллельные (аллотипические) вариации. В то же время различия между классами (подклассами) и типами цепей определяются неодинаковым строением C-областей (изотипические вариации).

Столь необычное строение цепей станет понятным, если вспомнить, каковы их биологические функции. Основным назначением иммуноглобулинов как антител является образование комплексов с антигенами, и в этом отношении они высокоспецифичны и резко отличаются друг от друга. В то же время разные по специфичности антитела обладают рядом общих биологических функций: связывание комплекса, фиксация на мембранах и прохождение через них. Такая двойственность свойств отражается в соответствующей двойственности структуры. По всей

Рис. 2. Схема строения молекулы иммуноглобулина G

Толстыми линиями обозначены вариабельные области полипептидных цепей, вертикальной стрелкой — «шарнирный» участок, на который действуют протеазы; при этом образуются Fab- и Fc-фрагменты



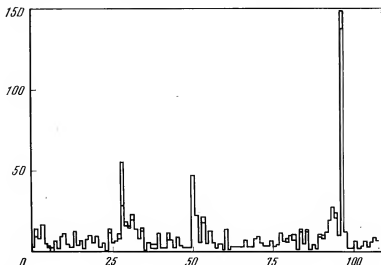


Рис. 3. Вариабельность аминоконцевых отрезков (V-областей) легких полипептидных цепей иммуноглобулинов человека (Wu, Kabat, 1970)

По оси абсцисс — положение аминокислотных остатков цепи; по оси ординат — индекс вариабельности (отношение частоты встречаемости различных аминокислот, находящихся в данном положении, к этой величине чаще всего встречающейся в этом же положении аминокислоты)

видимости, строение V-областей обуславливает специфические свойства антител, поскольку они строят активный центр, тогда как С-области обеспечивают свойства, общие для всех антител данного класса и типа.

V- и С-области легких цепей примерно равны по длине. Так, у каппа-цепей человека V-области строятся из 107—113 аминокислотных участков (начиная с N-конца), а на С-область приходится остальные 107 остатков. У тяжелых гамма-цепей длина V-областей примерно такая же, а С-область состоит из трех линейно расположенных друг за другом гомологичных участков C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} сходной длины, структурно гомологичных с С-областями легких цепей и друг с другом (см. рис. 2). V-области легких каппа- и ламбда-цепей различаются между собой, и они иные, чем у тяжелых цепей, тогда как V-области тяжелых цепей одинаковы у всех классов.

Среди легких цепей, выделенных из разных патологических иммуноглобулинов, нет ни одной, похожей на другие. Подсчитано, что различных идиотипических вариантов существует не менее нескольких тысяч. Несмотря на это многообразие, все варианты V-областей каппа-цепей укладываются в три основные подгруппы, причем различия между белками каждой подгруппы невелики. Таким же путем удалось классифицировать V-области ламбда-цепей, а в последнее время и V-области тяжелых цепей.

Аминокислотные замены, обуславливающие различия между V-областями, в большинстве своем сгруппированы в нескольких определенных участках — так называемых горячих точках. У легких цепей эти гипервариабельные области занимают положения 25—35, 52—55 и 89—96 (рис. 3), а у тяжелых гамма-цепей — 31—37, 86—91 и 101—109. Эти остатки, очевидно, участвуют в формировании активного центра антител.

Весьма закономерно в пептидных цепях иммуноглобулинов расположены внутрицепевых дисульфидных мостиков (см. рис. 2). Каждый из них образует петлю из части цепи длиной примерно в 60 остатков, а вправо и влево от нее имеется по 20 остатков. Таким образом, основной структурной единицей цепей является участок примерно в 100 остатков с одним дисульфидным мостиком. В легких цепях их два и они соответствуют V- и С-областям, а в гамма-цепях их четыре. В нативной цепи каждый из этих участков свернут в отдельную, относительно независимую компактную глобулу-домен (Putman, 1969).

1.1.3. Способы организации молекул иммуноглобулинов

Сейчас можно считать доказанной схему строения молекул IgG (см. рис. 1), предложенную Портером (Porter, 1973). Согласно этой схеме, молекула строится из L- и H-цепей, соединенных межцепевыми дисульфидными мостиками. При протеоллизе (например, папаином или трипсином), как показал Портер, молекула распадается на три фрагмента, два из которых идентичны друг другу и обладают антительной активностью (Fab-фрагменты). Они состоят из легкой цепи и половины тяжелой цепи. Третий фрагмент (Fc) состоит из С-концевых половин тяжелых цепей. Число связей между тяжелыми цепями варьирует и у разных подклассов IgG человека составляет от двух до пяти.

IgG встречается в двух формах — мономерной, сходной с молекулой IgG, и полимерной строящейся из двух или более мономерных единиц. Макроглобулины IgM построены из пяти мономерных субъединиц, напоминающих молекулу IgG.

Между разными по специфичности антителами, принадлежащими к одному классу (подклассу) и типу, крайне трудно обнаружить какие-либо различия в свойствах, за исключением их способности реагировать с антигенами. Таким образом, структура антител к самым разным антигенам весьма сходная, за исключением того небольшого участка, которым они непосредственно контактируют с антигенными детерминантами. Антигенами же могут быть самые разнообразные вещества (белки, полисахариды, синтетические вещества), которые имеют сильно отличающуюся конфигурацию и, по всей видимости, весьма различным образом расположенные антигенные детерминанты.

1.2. ВТОРИЧНАЯ И ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

За прошедшие годы была проведена очень большая работа по изучению вторичной и третичной структуры иммуноглобулинов (Dorrington, Tanford, 1970; Metzger, 1978), так как именно эти уровни организации белков определяют их разнообразные физико-химические и функциональные свойства. Тем сведениям, которые сейчас имеются в этой области, мы обязаны целому ряду физических методов. Ниже кратко охарактеризованы основные из них.

1.2.1. Методы изучения вторичной и третичной структур иммуноглобулинов

Наиболее важные исследования в области изучения пространственной структуры иммуноглобулинов выполнены в самое последнее время — речь идет об изучении кристаллов этих белков и их субъединиц с помощью рентгеновых лучей (Davies e. a., 1975a, b; Poljak, 1975; Huber, 1976).

Особенностью рентгеноструктурного метода является его применимость только к изучению белков в кристаллической форме. В процессе кристаллизации белок может стабилизироваться в одной из нескольких своих изоформ. Кроме того, его дифракционная картина является усредненной по времени. Это усложняет или делает вообще невозможным исследование динамического поведения белка, присущего ему в растворе. Поэтому хорошим дополнением к рентгеноструктурному анализу служат некоторые другие методы.

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния и рассеяния нейтронов основан на анализе распределения интенсивности рассеяния исследуемым раствором и дает информацию об общей форме и объеме макромолекул в растворе.

Метод дисперсии оптического вращения позволяет по зависимости величины вращения плоскости поляризации света, проходящего через образец, от длины волны определять степень α -спиральности и содержания β -структуры в белках.

Скорость водородно-дейтериевого обмена, которая измеряется по скорости изменения интенсивности определенных полос инфракрасного спектра белка после помещения его в тяжелую воду, характеризует компактность и стабильность белковой глобулы (Abaturov e. a., 1969).

Метод круговой поляризации флуоресценции является эмиссионным аналогом кругового дихроизма и отражает оптическую активность хромофора в его электроин-возбужденном состоянии. Так как только люминесцентные хромофоры (в основном триптофан) обуславливают спектры круговой поляризации флуоресценции, то этот метод является более избирательным, чем метод кругового дихроизма, при котором спектр обусловлен всеми адсорбирующими хромофорами. Иммуноглобулины особенно удобны для этого рода анализа, поскольку в каждом домене имеется очень мало (от одного до трех) остатков триптофана и, кроме того, они занимают сходное пространственное положение.

Принцип метода поляризации флуоресценции заключается в следующем: скорость выхода флуоресцентного красителя, связанного с белковой молекулой из плоскости поляризации возбуждающего флуоресценцию света, зависит при постоянной вязкости и температуре раствора от объема молекулы. Поэтому по зависимости параметра, характеризующего эту скорость, от вязкости раствора можно рассчитать эффективный радиус Стокса или эффективный объем молекулы. Они непосредственно связаны с временем корреляции молекулы. Подробнее об этом параметре сказано ниже.

Значительная часть материала, который обсуждается в данном обзоре, получена *методом спиновой метки*, поэтому остановимся на его описании подробнее.

Спиновая метка представляет собой стабильный нитроксильный радикал с общей структурой, изображенной на рис. 4. Уникальность мето-

да спиновой метки состоит в том, что он позволяет судить о локальных конформационных изменениях биополимеров в области присоединения метки. Теория метода и многочисленные результаты, полученные с его помощью при исследовании белков, нуклеиновых кислот, клеточных мембран и других объектов, подробно описаны в ряде обзоров и монографий (McConnell, McFarland, 1970; Лихтенштейн, 1974; Кузнецов, 1976; Spin labelling: theory and applications, 1976).

Рис. 4. Структура спиновой метки

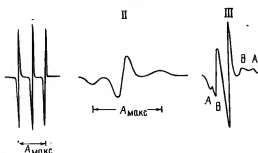
R определяет специфику связывания спин-меченого радикала с функциональными группами биополимеров



Спектр электронного парамагнитного резонанса (ЭПР спиновых меток) представляет собой триплет (рис. 5, I, II). Соотношение ширины этих трех линий определяется усреднением анизотропии g -фактора и сверхтонкого взаимодействия спинов ядра азота и неспаренного электрона N—O-группы метки в результате ее вращения. В некоторых случаях спектр ЭПР является суперпозицией двух спектров, соответствующих двум состояниям метки с различной подвижностью (рис. 5, III).

Рис. 5. Спектры электронного парамагнитного резонанса спиновой метки в различных условиях

- I — свободная вращающаяся метка (время корреляции $\sim 10^{-11}$ сек);
 II — иммобилизованная метка (время корреляции $\sim 10^{-7}$ сек);
 III — метка, способная находиться в двух микроокружениях A и B с различной микровязкостью. $A_{\text{макс}}$ — расстояние между крайними компонентами спектра ЭПР, в Гс



Существуют способы, позволяющие по соотношению ширины этих трех линий, по их положению на оси напряженности магнитного поля и по их зависимости от мощности микроволнового излучения рассчитывать времена корреляции меток в пределах от 10^{-11} сек до 10^{-3} сек (Stone e. a., 1965; Shimshick, McConnell, 1972; Goldman e. a., 1973; Thomas, McConnell, 1974). Время корреляции характеризует скорость вращения N—O-группы метки и качественно может быть представлено как величина, обратная частоте вращения метки. В тех случаях, когда метка связана с белком не жестко, изменение ее времени корреляции может отражать изменение конформации белка в области ее присоединения.

Когда метка связывается с белком жестко, т. е. ее N—O-группы не имеет собственной свободы вращения относительно белка, определяемое по спектру ЭПР время корреляции, равно времени корреляции макромолекулы (τ_m) (Shimshick, McConnell, 1972). В соответствии с законом Стока — Эйнштейна

$$\tau_m = \frac{4}{3K} \pi a_m^3 \frac{\eta}{T}, \quad (1)$$

где a_m — эффективный радиус Стокса макромолекулы, η — вязкость раствора, T — абсолютная температура, K — постоянная Больцмана. Зная, τ_m и η/T , всегда можно определить a_m .

В тех случаях, когда N—O-группа метки, ковалентно связанной с белком, сохраняет свободу вращения, ее спектр ЭПР определяется интенсивностью броуновского движения метки относительно макромолекулы и скоростью вращательной диффузии самой молекулы. Поэтому определяемое по спектру ЭПР изменение времени корреляции N—O-группы может быть вызвано изменением не только микроокружения метки, но и эффективного радиуса Стокса макромолекулы.

Для случая, когда движение N—O-группы метки относительно макромолекулы близко к изотропному, нами был предложен метод, позволяющий одновременно получать информацию не только об изменении микроокружения спиновой метки ($\Delta\tau_m$), но и о структурных перестройках в меченой макромолекуле, приводящих к изменению ее времени корреляции ($\Delta\tau_m$) (Nezlin *et al.*, 1973; Кяйвяряйнен, 1975).

Существуют приемы, позволяющие определять расстояния между нитроксильным радикалом и парамагнитным ионом металла (Taylor *et al.*, 1969; Лихтенштейн, 1968; Кяйвяряйнен, 1975б) или между двумя иминоксильными радикалами (Кокорин и др., 1972; Куликов и др., 1972). Они основаны либо на зависимости расщепления и дополнительного уширения линий от расстояния между парамагнитными центрами, возникающими при воздействии магнитных диполей, либо на зависимости амплитуды результирующего спектра ЭПР от величины мощности сверхвысокой частоты (кривая насыщения) (Куликов, 1976).

1.2.2. Структура доменов и субъединиц IgG

Описываемые в обзоре результаты в значительной степени базируются на недавно проведенных рентгеноструктурных анализах с высокой степенью разрешения (табл. 2).

Все изученные домены имеют очень сходную трехмерную структуру. Как можно было ожидать из данных по первичной структуре, гомологичные переменные домены или постоянные домены больше похожи друг на друга, чем переменные домены на постоянные.

Основной структурной характеристикой домена является антипараллельный слой бета-складчатости, который состоит из вытянутых сегментов полипептидных цепей, связанных изогнутыми частями (коленями) цепи (рис. 6). Два таких слоя подобно сэндвичу прилегают друг к другу с антипараллельным направлением сегментов цепи. Прилежающие сегменты связаны водородными связями. Один из слоев состоит из трех сегментов, а другой из четырех (см. рис. 6). Такая двухслойная структура особенно четко заметна у постоянного домена, где она носит более закономерный характер. У переменного домена отмечается дополнительная петля, содержащая вторую гипервариабельную область.

Как известно (Wu, Kabat, 1970), по первичной структуре остатки вариабельной области можно разделить на гипервариабельные, которыми обусловлены основные различия между цепями (см. рис. 3), и негипервариабельные, или каркасные, остатки. Гипервариабельные остатки доступны растворителям и у различных переменных доменов свернуты различным образом. Так, например, первая гипервариабельная область

Рис. 6. Пространственная модель постоянной области полипептидной цепи типа ламбда иммуноглобулинов человека (Poljak e. a., 1974)

Пунктирной линией показано положение дополнительной петли в переменной области, стрелками — положение антигенных областей маркеров Oz и Kern



легких цепей (L1) у белка Rei представляет собой вытянутую цепь, тогда как у белков New и Mcg она свернута в спираль. В этом месте у белка McPC 603 имеется вставка из шести остатков аминокислот, и эта область представляет собой вытянутую неспиральную петлю. В противоположность этому, хотя и с небольшими вариациями, расположение карбасных, неварьирующих остатков у разных доменов очень сходное. Эта гомология в третичной структуре переменных доменов указывает на то, что неварьирующие остатки создают ригидный каркас, в который как бы встраиваются гипервариабельные петли.

Таблица 2

Результаты рентгеноструктурного анализа иммуноглобулинов и их субъединиц

Белок	Разрешение, Å	Лиганд	Автор, год
Mcg, димер легких цепей типа ламбда у человека	2,3	Динитрофенильная группа и другие соединения	Schiffer e. a., 1973
New—IgG, пепсиновый Fab-фрагмент человека (гамма-1- и ламбда-цепи)	2,8	Витамины K ₁ -ОН и другие соединения	Poljak e. a., 1974
Rei, димер переменных доменов легких каппа-цепей человека	2,8	—	Epp e. a., 1975
McPC 603—IgA, пепсиновый Fab-фрагмент мыши (альфа- и ламбда-цепи)	3,1	Фосфорилхолин	Segal e. a., 1974
Kol, IgG человека, нерасщепленная молекула	5	—	Colman e. a., 1976
Fc-фрагмент человека	3,5	—	Deisenhofer e. a., 1967a, b

Четыре домена (два переменных и два постоянных) образуют один Fab-фрагмент. При этом отмечаются следующие закономерности.

1. Оба постоянных домена взаимодействуют более тесно, что обуславливает большую компактность всей постоянной области по сравнению с переменной. Это объясняется тем, что постоянные домены взаимодействуют между собой четырехсегментными слоями, образуя большую контактирующую поверхность, тогда как переменные домены взаимодействуют трехсегментными слоями.

2. Основные взаимодействия между доменами являются латеральными, т. е. и переменные, и постоянные домены взаимодействуют между собой, тогда как продольные взаимодействия (между переменными и постоянными) выражены меньше.

3. Оба домена тяжелой цепи, т. е. V_H и C_H , находятся в более тесном контакте, чем оба домена легкой цепи, что вызывает небольшой изгиб всего Fab-фрагмента. Такой же изгиб присущ димеру легких цепей. Последний строится из двух идентичных по своей первичной структуре легких цепей — мономеров. Несмотря на это, угол между доменами у одного мономера равен 70° , тогда как у другого — 110° , что и обуславливает изгиб всей молекулы.

Структура Fc-фрагмента отличается отсутствием такого изгиба. Оба C_H3 -домена тесно прилегают друг к другу, подобно C_L - и C_H1 -доменам в Fab-фрагменте, тогда как C_H2 -домены не контактируют между собой, за исключением ковалентной связи в шарнирной области. Возможно, такое расположение C_H2 -доменов необходимо для их взаимодействия с первым компонентом комплекса. Следует отметить, что результаты рентгеноструктурного анализа иммуноглобулинов полностью согласуются с полученными ранее данными других методов.

Так, например, с помощью оптических методов — дисперсия оптического вращения (Троицкий и др., 1971) и инфракрасная спектроскопия водородо-дейтериевым обменом (Abaturov e. a., 1969) — было найдено, что основным элементом вторичной структуры пептидных цепей иммуноглобулинов является бета-складчатость.

Кроме того, есть данные свидетельствующие в пользу гипотезы доменов (Edelman, 1973). Согласно этой гипотезе, каждый гомологичный участок полипептидной цепи иммуноглобулинов длиной около 110 аминокислотных остатков с одной внутренней дисульфидной связью (см. рис. 2 и 6) сворачивается в отдельную, относительно независимую глобулу — домен. Например, легкие цепи состоят из двух доменов, тяжелые гамма-цепи — из четырех. Между глобулами имеются открытые участки полипептидной цепи, особенно чувствительные к протеолитическим ферментам. Одним из самых важных доказательств доменной структуры пептидных цепей иммуноглобулинов как раз и явилась возможность использования протеаз для расщепления легких цепей на половины, которые не изменяли существенно своей третичной структуры по сравнению с таковой в нативной цепи. Последнее было доказано как оптическими методами (Karlsson e. a., 1972), так и исследованиями антигенных свойств половин (Vengerova e. a., 1972).

Уже к середине 60-х годов были получены весьма обоснованные данные, базирующиеся в основном на изучении рекомбинации тяжелых и легких цепей (Фраеке, Незлин, 1963) и мечении по родству (Singer e. a., 1971), о том, что аминокислотные остатки как легкой, так и тяжелой цепи участвуют в образовании активного центра. На моделях, основан-

ных на данных рентгеноструктурных исследований активных Fab-фрагментов, действительно видно, что обе цепи формируют полость активного центра. Классические исследования Кабата (Kabat, 1976), Каруша (Kagush, 1962) и Села (Sela, 1970) о размерах активного центра также находятся в хорошем согласии с рентгеноструктурными исследованиями фрагментов двух миеломных белков с антигенсвязывающей активностью.

1.3. СТРОЕНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Рентгеноструктурным методом при высоком разрешении были изучены Fab-фрагменты двух миеломных белков — IgG человека (New) и IgA (McPC 603) мыши (см. табл. 2). Было обнаружено, что первый из этих белков реагирует при высокой степени сродства с рядом соединений, в частности с оксипроизводным витамина K_1 (K_1 —ОН). Второй миеломный белок, синтезируемый миеломой мышей McPC 603, способен преципитировать с несколькими природными антигенами, в том числе с полисахаридами пневмококков, а также реагировать с фосфорилхолином, который является активной частью указанного антигена. Оба эти белка являются хорошей моделью для изучения комплексов антиген—антитело, поскольку удалось получить кристаллы их Fab-фрагментов вместе с соответствующими гаптенами.

На атомных моделях Fab-фрагментов, построенных на основании рентгеноструктурных данных, видно, что переменные домены легкой и тяжелой цепи соединены таким образом, что гипервариабельные участки образуют единую поверхность контактирующую с антигеном. Полость активного центра у обоих белков отличалась по своей форме и величине. У белка McPC 603 активный центр представляет собой довольно глубокую впадину, шириной около 15 Å и глубиной 12 Å, тогда как у белка New он похож на неглубокий желоб, ширина и глубина которого равны примерно 6 Å, а длина — 15 Å. Эти различия обусловлены вставками в трех гипервариабельных участках белка McPC 603. На рис. 7 показана область активного центра белка New с расположенным в нем гаптенем (витамин K_1 —ОН). Полость сформирована 23 остатками из гипервариабельных сегментов L1 и L3 легкой цепи и сегментов H1, H2 и H3 тяжелой цепи. Нафтохиноновое кольцо гаптена находится в тесном контакте с фенольным кольцом тирозина (Тир-90) легкой цепи и другими двумя остатками этой же цепи и одним остатком тяжелой цепи. Фитиловая часть гаптена взаимодействует с четырьмя остатками тяжелой цепи и далее с боковыми группами трех других остатков гипервариабельной области H2. Всего этот гаптен реагирует примерно с 10 остатками, т. е. только с частью всех остатков активного центра.

Как указывалось выше, полость активного центра мышинного белка McPC 603 больше и формируется из 35 остатков гипервариабельных областей как легкой, так и тяжелой цепи. Как видно из рис. 8, фосфорилхолин располагается в глубокой впадине. Холиновая часть реагирует с остатками как тяжелой, так и легкой цепи, тогда как фосфат взаимодействует лишь с остатками тяжелой цепи. Так же как и в предыдущем случае, гаптен заполняет лишь часть полости активного центра. Остающаяся часть, по-видимому, способна реагировать с носителем гаптена.

При изучении некоторых свойств активных центров весьма полезным оказался метод спиновой метки (Ингрэм, 1972).

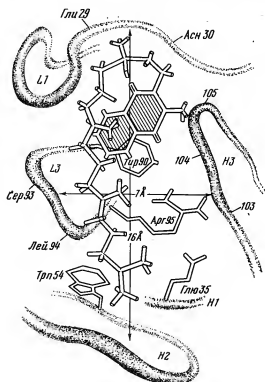


Рис. 7. Активный центр белка с расположенным в нем гаптенем — витамином K_1-OH (Davies *et al.*, 1975a, b)

Л1, Л3, Н1, Н2, Н3 — гипервариабельные участки легких и тяжелых полипептидных цепей

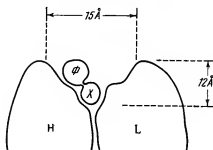


Рис. 8. Расположение гаптена (антигенного детерминанта) фосфорилхолина в активном центре миеломного белка McPC 603 мыши (Padlan *et al.*, 1974)

Ф — фосфат;
Х — холин;
Н — тяжелые полипептидные цепи;
Л — легкие полипептидные цепи

1.3.1 Жесткость и глубина активных центров антител

Впервые спин-меченый гаптен для изучения активных центров антител использовали Страйер и Гриффит (Stryer, Griffith, 1965). Гаптен состоял из 2,4-динитрофенола (ДНФ), к которому было получено антитело, и присоединенного к нему иминоксильного радикала. В результате образования специфического комплекса наблюдалась сильная иммобилизация спин-меченого гаптена. Ограничение свободы вращения гаптена в полости активного центра может быть вызвано стерическими препятст-

виями, гидрофобными и вандерваальсовыми взаимодействиями и свидетельствует о значительной структурной жесткости активного центра.

Хсиа и Пьетт (Hsia, Piette, 1969) с помощью моновалентного и бивалентного спин-меченых ДНФ-гаптенов исследовали глубину и гетерогенность активных центров кроличьих анти-ДНФ-антител. Они изучали зависимость времен корреляции спин-меченого моновалентного ДНФ-гаптена, связанного с активным центром антитела, от $Na+d$ где, Na — длина самого гаптена, d — расстояние между гаптенем и меткой, которое можно изменять, наращивая углеводородную цепочку между ними. При изменении $Na+d$ от 10 до 12 Å авторы наблюдали резкое уменьшение времен корреляции метки, которое далее менялось мало. Это уменьшение объясняется тем, что $Na+d$ в указанных пределах начинает превышать глубину активного центра и метка, выходя из него, обретает способность к свободному вращению. Из этого следует, что глубина активных центров равна 10—12 Å. Сходные данные были получены в опытах с бивалентными гаптенами. При добавлении к антителам бивалентного гаптена в избытке наблюдали сильно иммобилизованный спектр ЭПР в результате образования димеров или тримеров антител. Минимальная длина бивалентного гаптена, при которой способность связывать две молекулы антитела еще сохранялась, была равна 21 Å. Очевидно, минимальная глубина активного центра составляет 10,5 Å.

Размеры активных центров антител, по-видимому, мало зависят от видовой специфичности. Так, с помощью того же приема последовательного увеличения расстояния между ДНФ и спиновой меткой было показано, что глубина активных центров цыплячьих анти-ДНФ-антител к миелиновым мышечным IgA МОРС 315, имеющих высокое сродство к ДНФ, равна 10 ± 1 Å (Piette e. a., 1971). Другая группа авторов (Dwek e. a., 1975), исследуя структуру центра Fv-фрагмента белка МОРС 315 методом спин-меченых гаптенов, пришла к аналогичному результату.

Таким образом, сведения о глубине активных центров антител, полученные методом спиновой метки, находятся в хорошем согласии с данными рентгеноструктурного анализа.

Спин-меченые гаптены были использованы (Willan e. a., 1977) для сравнительного изучения размеров активных центров следующих миелиновых IgA с анти-ДНФ-активностью: МОРС 315, МОРС 460 и XRPC 25. Анализ спектров ЭПР иммунных комплексов спин-меченых ДНФ и ряда его производных с учетом стереохимии этих гаптенов привел к следующим выводам. Глубина активных центров всех трех IgA одинакова (11—12 Å), но существуют различия в поперечных размерах центров у входа. Для XRPC 25 этот размер составляет $7,5 \times 8$ Å, для МОРС 460 $\geq 10 \times 11$ Å, а для МОРС 315 $\geq 8 \times 11$ Å. Все три белка имеют участки связывания лантанидов La III и Gd III. Обнаружено взаимодействие между этими участками и активными центрами. В МОРС 460 и 315 расстояние между металлом и N—O-группой спин-меченого гаптена около 10 Å, а в XRPC — 25—20 Å.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) высокого разрешения (270 МГц) был применен той же группой авторов для изучения активного центра Fv-фрагмента МОРС 315 (Dower e. a., 1977). Специальные расчеты позволили определить геометрию активного центра в комплексе с гаптенем ДНФ, образующим вандерваальсовы взаимодействия с членами ароматическими аминокислотами центра.

Обнаружено, что полосы в спектре ЯМР, соответствующие фенилаланиновым или тирозиновым остаткам, уширяются в присутствии гаптена. Наиболее вероятное объяснение этому — уменьшение подвижности соответствующих остатков, способных флукутировать с частотой порядка 10^4 Гц.

1.3.2. Различия в свойствах активных центров антител после первичного и вторичного иммунных ответов

Метод спинной метки позволил также уловить различия в свойствах кроличьих антител к 2,4,6-тринитрофенилу (ТНФ) после первичной и вторичной иммунизации (Hsia, Little, 1971). Эти антитела исследовали с помощью отличных по пространственной структуре спин-меченых ТНФ-гаптенов как методом ЭПР, так и по уменьшению квантового выхода флуоресценции антител. Обнаружено, что антитела, образуемые в ходе первичного и вторичного иммунных ответов, имеют различия в строении активных центров. Комплексы первичных антител с гаптенами являются менее жесткими и более чувствительными к действию органических растворителей и к стерическим изменениям лигандов.

1.3.3. Активные центры антител к заряженным гаптенам

Пиетт и сотрудники (Piette e. a., 1972) исследовали комплексы отрицательно заряженного спин-меченого бензоата и комплексы положительно заряженного спин-меченого триметилфениламмония с соответствующими кроличьими антителами. Судя по спектрам ЭПР, комплексы антител с отрицательно заряженными спин-мечеными гаптенами являются более жесткими, чем комплексы антител с положительно заряженными спин-мечеными гаптенами. Кроме того, было обнаружено, что степень иммобилизации N—O-группы спин-меченого бензоата в активных центрах антител варьировала индивидуально у разных кроликов.

1.3.4. Перекрестная реактивность антител

Хсна и Пиетт (Hsia, Piette, 1969) исследовали перекрестную реактивность и структурную гетерогенность кроличьих анти-ДНФ-антител. Они сравнивали спектры ЭПР антител, выделенных с помощью гомологичного ДНФ-(анти-Д) и перекрестного гаптена (анти-Т) после взаимодействия со спин-меченым ДНФ (ДНФ-СМ). $A_{\text{макс}}$ (см. рис. 4) спектра ЭПР комплекса анти-Д- и ДНФ-СМ оказалось равным 59 Гс, $A_{\text{макс}}$ спектра комплекса (анти-Т+ДНФ-СМ) — 62 Гс. $A_{\text{макс}}$ является функцией времени корреляции и полярности окружения N—O-группы (Гамильтон, Мак-Коннел, 1970). Поэтому различия в этих спектрах ЭПР могут быть обусловлены или большей иммобилизацией группы N—O в комплексе (анти-Д+ДНФ-СМ), или большей гидрофобностью ее окружения. В любом случае они указывают на структурные различия активных центров анти-Д и анти-Т.

В другой серии опытов исследовали комплексы анти-Д с гомологичным ДНФ-СМ и перекрестными спин-мечеными гаптенами орто- и па-

ранитрофенолами: оНФ-СМ и пНФ-СМ (рис. 9). А_{макс} спектров ЭПР перекрестных спин-меченых гаптен-ов, аНХ-СМ и пНФ-СМ, расположенных в активных центрах, также оказалось больше, чем у гомологичного ДНФ-СМ. Авторы объясняют это тем, что гомологичный гаптен расположен в активном центре таким образом, что N—О-группа метки непосредственно не взаимодействует с аминокислотными остатками активного центра. С другой стороны, перекрестный гаптен образует менее жесткий комплекс, при котором метка имеет большую степень свободы, что

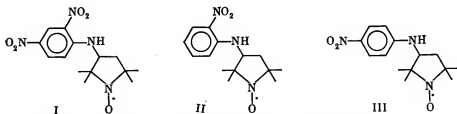


Рис. 9. Гомологичный (I) и перекрестные (II, III) спин-меченые гаптены

I — динитрофенол; II — ортонитрофенол; III — паранитрофенол

позволяет ей взаимодействовать с гидрофобными участками активного центра. Спектры ЭПР спин-меченых перекрестных гаптен-ов отличаются от гомологичного еще присутствием компонент, соответствующих более быстрому вращению. Это может быть следствием существования равновесия между двумя ориентациями спин-меченых гаптен-ов в активных центрах или неодинакового сродства у различных популяций антител, специфичных к соответствующему гаптену.

Хсиа и Литтл (Hsia, Little, 1973) исследовали взаимодействие двух спин-меченых гаптен-ов — ДНФ-гидразинового производного N-1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролидона (I) и N-1-(оксил-2,2,5,5-тетраметил-3-метилламинопирролидинил)2,4-динитробензола (II) с двумя мнеломными IgA — МОРС 315 и 460 как методом ЭПР, так и по уменьшению квантового выхода флуоресценции белка. Обнаружено, что при связывании гаптен-ов I и II белком МОРС 315 N—О-группы в обоих случаях находятся в сильно иммобилизованном состоянии, но в спектре ЭПР соединения II в отличие от спектра соединения I наблюдаются два типа иммобилизованных компонент. При связывании с белком МОРС 460 свобода вращения N—О-группы соединения I также значительно ограничена, в то время как на вращение N—О-группы соединения II связывание с этим белком влияет мало. Однако, судя по близкому уменьшению квантового выхода флуоресценции белков при связывании спин-меченых гаптен-ов и по результатам исследования термодинамики этого процесса, сродство соединений I и II к белкам МОРС 315 и 460 различается незначительно. Следовательно, степень иммобилизации N—О-группы спин-меченого гаптена не во всех случаях характеризует прочность комплекса. По мнению авторов, различия в иммобилизации соединений I и II могут вызываться двумя причинами: 1) лиганды связываются в различных участках конформационно жесткого активного центра, 2) конформация активного центра может стабилизироваться в той или иной степени в зависимости от различий в структуре лигандов.

В другой работе (Wong e. a., 1974) исследовались причины, вызывающие появление двух типов иммобилизованных компонент в спектре ЭПР комплекса II с белком МОРС 315. Было показано, что оно обусловлено двумя энантиомерными формами спин-меченого гаптена II. Группа N—O одной из форм лиганда при этом попадает в менее гидрофобное микроокружение, а второй — в более гидрофобное, что обуславливает различное положение иммобилизованных компонент на оси напряженности магнитного поля. Связывание разделенных энантиомерных форм (спин-меченых аминов — ДНФ) белком МОРС 315 приводило к появлению только одного типа компонент.

1.3.5. Практическое применение метода спин-меченых гаптенa

Замещение спин-меченых гаптенa в активных центрах антител гомологичными гаптенами было использовано Леутом и сотрудниками (Leute e. a., 1972) для определения концентрации морфина в исследуемом растворе. В этом методе использовался эффект сильного увеличения высоты линий спектра ЭПР спин-меченого морфина при его переходе из иммобилизованного состояния в свободное в результате вытеснения из активного центра. Высота узких линий расторможенного спектра ЭПР характеризует в данном случае концентрацию морфина в исследуемом растворе. Нижний предел чувствительности такого метода — 10^{-7} М морфина (0,03 мкг/мл). В дальнейшем этот подход получил развитие (Montgomery e. a., 1975) и был применен для определения концентрации ряда лекарственных веществ в сыворотке. Он оказался в 100 раз чувствительнее обычного химического метода и обладал высокой специфичностью. Для одного определения достаточно 50 мкл сыворотки.

Хсиа и сотрудники (Hsia e. a., 1973a) использовали комплекс ДНФ — метил-2,4-динитробензол с мнеломным иммуноглобулином А (МОРС 315) как модельную систему для исследования перекрестной активности этого белка по отношению к ДНФ и его аналогам. О количестве свободного, вытесненного из активных центров спин-меченого гаптена судили по интенсивности высокопольной компоненты спектра ЭПР. Количественные оценки, полученные этим методом, находятся в хорошем соответствии с результатами равновесного анализа. Предложенный метод является весьма перспективным в иммунохимических исследованиях.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы о строении активного центра антител.

Источником разнообразия трехмерной структуры активного центра являются в основном число и природа остатков гипервариабельных петель. Наиболее выраженные изменения обусловлены множественными вставками и делециями в гипервариабельных областях.

Единичные аминокислотные замены также могут производить значительные изменения активного центра. Например, замена одного остатка с положительным зарядом на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту может заметно повлиять на специфичность антитела.

Не все остатки гипервариабельных областей вовлекаются непосредственно в контакт с антигеном. Некоторые из них располагаются внутри домена, а другие участвуют в контактах между вариабельными домена-

ми. Однако изменения длины участков внутри домена могут также обусловить значительные изменения полости активного центра. Сходным образом замены контактирующих остатков могут оказать заметный эффект на конфигурацию гипервариабельных петель, которые не являются абсолютно ригидными.

Имеющиеся данные указывают, что комплексообразование антигенов с антителом обусловлено вандерваальсовыми взаимодействиями, водородными и полярными связями, а распределение этих сил определяет специфичность этой реакции и жесткость иммунных комплексов.

1.4. ФОРМА И ГИБКОСТЬ МОЛЕКУЛ АНТИТЕЛ

Из изложенного выше видно, что рентгеноструктурные исследования отдельных фрагментов иммуноглобулинов и их цепей оказались очень успешными. Однако они не дали ответа на два важных вопроса: каково в целой молекуле относительное расположение всех трех субъединиц и существуют ли конформационные изменения молекулы антител после взаимодействия их с антигеном?

Интактные молекулы иммуноглобулинов кристаллизуются с большим трудом, что обусловлено, вероятно, гетерогенностью их препаратов, а также гибкостью молекул иммуноглобулинов. Поэтому для изучения общей структуры молекул иммуноглобулинов применяли иные методы. В нескольких лабораториях использовали *метод электронной микроскопии*. В классическом исследовании Валентайна и Грина (Valentine, Green, 1967) изучали растворимые комплексы антител против динитрофенильной группы с бивалентным гаптеном. На полученных микрофотографиях были видны циклические структуры различной формы. Они представляют собой димеры, тримеры, тетрамеры и пентамеры молекул антител, связанных между собой гаптеном (рис. 10). Весьма примечательно, что угол между Fab-фрагментами варьировал у разного типа агрегатов, что указывало на возможность его изменения вследствие гибкости связывающих Fab-фрагменты участков полипептидных цепей.

Другая серия экспериментов, выполненных также электронно-микроскопическим методом, была проделана Файнштейном и Муиком (Feinstein, Muir, 1969). Эти авторы изучали комплексы IgM — антитела с флагеллами сальмонелл (рис. 11). В некоторых случаях молекулы IgM — антитела прикреплялись к флагеллам с образованием структур, подобных П-образным скрепкам (рис. 11, 7). Скорее всего, такие структуры являются молекулами IgM, субъединицы которых не отходят радиально как у свободных молекул, а направлены вниз от центрального диска к поверхности флагеллы с образованием фигуры, похожей на стол с ножками. Последняя в профиль подобная П-образной скрепке. Вероятнее всего, что появление подобных структур объясняется гибкостью молекул иммуноглобулинов, т. е. способностью Fab-фрагментов вращаться относительно центрального диска, образованного пятью Fc-фрагментами.

Для решения вопроса о существовании независимого вращения субъединиц иммуноглобулинов большую помощь оказал *метод поляризации флюоресценции*. Основной подход, который использовался в этих опытах по изучению гибкости иммуноглобулинов, заключался в сравнении экспериментально определяемого времени корреляции молекулы иммуноглобулина, характеризующем найденное в опыте время выхода моле-

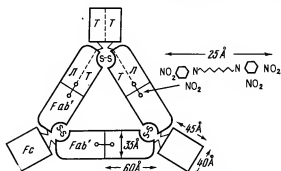


Рис. 10. Комплекс из трех молекул IgG-антитела и бивалентного ДНФ-гаптена (Valentine, Green, 1967)

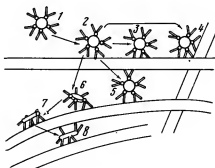


Рис. 11. Схема взаимодействия IgM-антитела и флагеллярного антигена, основанная на электронно-микроскопических данных (Fainstein, Muller, 1969)

Свободная молекула (1) привязывается к флагелле сначала одной точкой (2), а затем либо к одной (3), либо к двум нитям (4, 5, 8); П-образная структура (7) может образоваться из промежуточной формы (6)

кулы из плоскости поляризованного света, с временем корреляции, рассчитанным исходя из предположения о жесткости молекулы. Так, если считать молекулу IgG жестким эллипсоидом вращения с соотношением осей 1 : 2 и молекулярным весом 150 000, время корреляции этой молекулы должно быть равным 73 нсек, а экспериментально наблюдаемое, как правило, было значительно меньшим: 20—40 нсек (Zagayansky e. a., 1969; Nezlin e. a., 1970, 1972; Cathou e. a., 1974). Это указывает на способность фрагментов к независимому относительному перемещению и, следовательно, на гибкость связывающих их участков полипептидных цепей. Сходные данные были получены с помощью спиновых меток.

Стайер и Гриффит (Stryer, Griffith, 1965) для определения времени корреляции спин-меченого гаптена, связанного с антителом, изучали поведение вещества, содержащего одновременно как флуорохромную группировку, так и спиновую метку в растворах различной вязкости. Изменяя вязкость раствора добавлением глицерина, добивались совпадения его спектра ЭПР со спектром спин-меченого гаптена, связанного с активным центром. Затем методом поляризации флуоресценции определяли время корреляции. Найденное таким образом время корреляции N—O группы связанного спин-меченого гаптена оказалось равным 12 нсек. При этом авторы справедливо отмечают, что это значение может быть занижено по сравнению с временем корреляции Fab-фрагмента, так как нельзя исключить возможность вращения иминоксильного кольца относительно динитрофенильной группы, жестко связанной с активным центром. Этот недостаток является общим для всех попыток определить время корреляции Fab-фрагмента IgG, используя спин-меченый гаптен.

Хсия и Пиетт (Hsia, Piette, 1969) для определения времени корреляции связанного с активным центром спин-меченого гаптена строили калибровочную зависимость спектров ЭПР от вязкости раствора спиновой метки. Время корреляции τ , соответствующее тому или иному спектру, определяли по закону Стокса — Эйнштейна (формула 1), считая, что эффективный радиус Стокса метки равен 5 Å. Самый короткий спин-меченый гаптен, наиболее жестко связанный с активным центром, имел время корреляции 39 нсек. Двек и соавторы (Dwek e. a., 1975a) рассчитали время корреляции спин-меченого ДНФ, локализованного в активных центрах IgA (MOPC 315) и его Fab- и Fv-фрагментов. Оно оказалось равным 44,4, 23 и 6,5 нсек соответственно.

1.4.1. Определение времени корреляции с помощью спиновых меток, локализованных в активных центрах антител

Получены кроличьи антитела непосредственно против спиновой метки 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-амино(N-дихлортриазина), служившей при иммунизации гаптенем (Käiväräinen e. a., 1973; Кяйвяряйнен и др., 1974). Результатом образования специфических комплексов антител, их пепсиновых и папаиновых фрагментов со спиновой меткой была ее сильная иммобилизация. Смешивание соответствующих количеств растворов неспецифических кроличьих IgG и метки в аналогичных условиях приводило лишь к появлению спектра ЭПР свободной метки. Время корреляции меток рассчитывали по Шимшику и Мак-Коннеллу (Shimshick, McConnell, 1972). Для комплексов спиновой метки с антителами, Fc- и Fab-фрагментами в области изоэлектрической точки (pH 6,3) оно оказалось равным 32, 30 и 18 нсек соответственно.

Полученные нами значения времени корреляции для IgG и Fab-фрагментов подтверждаются в упомянутой работе (Dwek e. a., 1975a, b).

Различия во времени корреляции, полученные для Fab-фрагмента, как изолированного, так и входящего в состав $F(ab')_2$ и интактного антитела указывают на ограничения свободы вращения Fab-фрагментов, накладываемые взаимодействием субъединиц $F(ab')_2$ и IgG. Повышение температуры приводило к уменьшению приведенного к стандартным условиям ($\eta/T = 3 \cdot 10^5$ П/°C) времени корреляции комплексов метки с $F(ab')_2$ и IgG. По-видимому, при нагревании свобода относительно перемещения их субъединиц возрастает. Возможность получения антител к спиновой метке, служившей при иммунизации гаптенем, подтверждена в другой работе (Humphries, McConnell, 1976).

1.4.2. Сравнительное изучение гибкости иммуноглобулинов G и E методом нежестко связанных меток

Нашим методом (Кяйвяряйнен, 1975b) было определено собственное время корреляции спиновых меток, связанное с фрагментами IgG и миеломным IgE(Yu) человека вне активного центра (τ_R), и время корреляции самих фрагментов в составе интактных молекул (τ_M) (Nezlin e. a.,

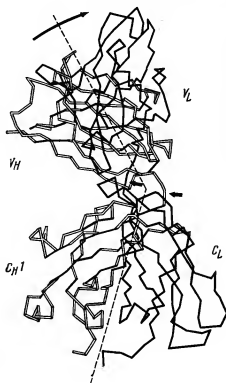


Рис. 12. Схема альфа-углеродного остова Fab-фрагмента белка New (Poljak *et al.*, 1974)

Домены тяжелой цепи (V_H и C_H1) обозначены сплошной линией, легкой цепи (V_L и C_L) — двойной линией. Две короткие стрелки указывают на участки цепи между доменами, длинная стрелка показывает возможное направление вращения вариабельных доменов относительно постоянных доменов

1973). Значение τ_R для IgG и IgE оказалось равным 9 и 8,5 нсек, а τ_M — 35 и 60 нсек соответственно. Значение τ_M , полученное для IgG (35 нсек), находится в хорошем соответствии со значением τ_M для IgG кролика (32 нсек), определенным методом жестко связанной метки. Параллельно были определены τ_M для этих белков методом поляризации флуоресценции, и времена корреляции, полученные обоими методами, оказались близкими. Очевидно, что относительное перемещение фрагментов IgE менее свободно, чем перемещение фрагментов IgG из-за дополнительных взаимодействий между субъединицами IgE по сравнению с IgG или же из-за особого характера S—S связей ϵ -цепей (Bennich, Bahr-Lindström, 1974).

По мнению Хубера (Huber, 1976), в лаборатории которого были выполнены рентгеноструктурные исследования молекулы миеломного иммуноглобулина G (Colman *et al.*, 1975), существует три типа гибкости молекулы IgG. Первый тип — это обсуждавшаяся выше способность субъединиц, подобных папаиновым Fab-фрагментам, вращаться относительно друг друга, что зависит от шарнирного участка тяжелой цепи между этими субъединицами и дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Второй тип гибкости определяется участками цепи между вариабельными и постоянными доменами Fab-фрагментов, позволяющими этим доменам перемещаться относительно друг друга, как это показано на рис. 12. Третий тип гибкости зависит от участка тяжелой цепи, расположенного ближе к COOH-концу тяжелой цепи после дисульфидной связи между тяжелыми цепями. По мнению Хубера (Huber,

1976), этот тип гибкости может объяснить подвижность Fc-фрагмента относительно обоих Fab-фрагментов, которая обусловила слабую, неинтерпретируемую электронную плотность в области Fc-фрагмента при рентгенокристаллографическом анализе интактного миеломного IgG (Colman *et al.*, 1975).

Таким образом, имеется ряд убедительных доказательств в пользу существования независимого относительного движения отдельных субъединиц иммуноглобулинов. Можно предположить, что такого рода гибкость молекул иммуноглобулинов важна для оптимальной реакции антител, имеющих одинаковое стерическое строение, с антигенами, пространственная структура которых очень разнообразна. Гибкость, в частности, очень важна для реакции антитела обоими активными центрами с одной молекулой антигена. В этом случае, как следует из данных, полученных в лаборатории Каруша (Karush, 1970), реакция антиген—антитело более эффективна, чем в случае, когда антитело реагирует с небольшим моновалентным гаптеном той же специфичности.

Возможность свободного вращения активных Fab-фрагментов относительно друг друга сильно влияет на характер реакции антител с антигеном. Так называемые неполные антитела кролика против эритроцитов неспособны вызвать реакцию агглютинации. Однако после разрыва единственного дисульфидного мостика между тяжелыми цепями эти же антитела агглютинируют эритроциты (Romans *et al.*, 1977). Объяснить этот результат можно тем, что при восстановлении дисульфидной связи молекула антитела приобретает способность реагировать сразу с двумя эритроцитами из-за снятия каких-то ограничений, накладываемых этой связью, и вследствие этого появления относительной свободы движения Fab-фрагментов.

Аналогичным образом от гибкости молекулы антитела зависит, вероятно, и способность к образованию специфического преципитата. Антитела свиней в ходе иммунизации ДНФ-группой теряют свою способность преципитировать с ДНФ-белком. При изучении методом поляризации флуоресценции¹ оказалось, что так называемые ранние антитела, способные к преципитации, имеют более гибкую структуру, чем поздние антитела той же специфичности, но неспособные к образованию преципитата.

1.5. КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ АНТИТЕЛА В РЕЗУЛЬТАТЕ РЕАКЦИИ С АНТИГЕНОМ

Проблема существования конформационных изменений в молекуле антитела при реакции с антигеном представляет интерес как для биохимиков, изучающих структуру белков, так и для иммунологов. Известно, что есть свойства, общие для всех молекул антител данного класса, например: связывание комплемента, действие на тучные клетки (которое приводит к выбросу из них гистамина), а также стимуляция лимфоцитов с последующей дифференцировкой и синтезом антител либо толерантностью. За все эти функциональные свойства ответственны определенные участки Fc-фрагмента, однако при физиологических условиях

¹ Работа выполнена совместно Е. И. Дудич, Р. С. Незлиным и Ф. Франеком.

они проявляются лишь после присоединения антигена к молекуле антитела. Механизм этого действия антигена не совсем ясен до сих пор. За последние годы в нескольких лабораториях получены доказательства того, что антиген вызывает конформационные изменения в Fab-фрагменте, которые в свою очередь передаются на Fc-фрагмент, вызывая в нем соответствующие изменения. Одна группа исследователей указывает на уменьшение объема молекулы антитела после образования специфического комплекса, другие говорят о возможности изменений в структуре Fc-фрагментов как следствии реакции антиген — антитело.

На уменьшение объема молекулы антитела указывают данные, полученные с помощью *малоуглового рассеяния рентгеновых лучей* в лаборатории Краткого (Pilz e. a., 1973, 1974). Этот метод дает ценную информацию об общей форме и объеме макромолекул в растворе, причем получаемые при этом данные совпадают с величинами, определяемыми другим методом, а именно малоугловым рассеянием нейтронов (Csar e. a., 1976). В одной серии опытов в качестве антигена использовался большой по размерам антиген — производное бета-лактозида (Pilz e. a., 1974). Если около 50% всех активных центров антител были заняты этим антигеном, то радиус гирации и объем молекулы антитела уменьшались на 2—3%. В другой серии опытов (Pilz e. a., 1973) в качестве антигена использовался тетрааланин. При заполнении на 90% всех активных центров антигеном наблюдались еще большие изменения молекулы антитела — снижение радиуса гирации на 7,7% и уменьшение объема на 10%.

По-видимому, увеличение компактности антител при связывании антигенной детерминанты является общим свойством иммуноглобулинов, не зависящим от класса. Например, для IgM с антительной активностью к N-(4-нитрофенил)-NH₂-капроату обнаружено, что образование специфического иммунного комплекса уменьшает скорость водородно-дейтериевого обмена как цельной молекулы IgM, так и ее Fab-фрагментов (Ashman e. a., 1971a). Это является следствием более плотной упаковки белка под действием лиганда.

За последние годы в нескольких исследованиях был применен относительно новый метод *круговой поляризации флуоресценции*. Для выявления изменений в спектрах использовали крупные антигены, не содержащие триптофана — РНКазы, полиаланил-полилизинполипептиды и «петлевой» пептид лизоцима (Schlessinger e. a., 1975a, b; Givol e. a., 1974). У всех изученных антител спектры значительно менялись после взаимодействия с соответствующим антигеном, и эти изменения носили очень сходный характер. Это заставляет думать о том, что наблюдаемый эффект зависит от постоянных областей молекулы. В тех случаях, когда с антигенами взаимодействовали изолированные Fab-фрагменты, изменения в спектрах носили иной характер, так как наблюдались в других участках спектров. Поэтому закономерно предположение, что изменения Fc-фрагментов ответственны за те изменения, которые наблюдались при изучении целых молекул антител и отсутствовали при изучении изолированных Fab-фрагментов.

Сходные результаты были получены при использовании того же метода с антиполисахаридными антителами (Jaton e. a., 1975b). В качестве антигенов использовали олигосахариды возрастающей длины, в том числе тетра-, гекса- и октасахариды и 16-членный олигомер. Как и в вышеописанных опытах, после взаимодействия с антигеном наблюда-

лись изменения спектров, хотя при использовании изолированных Fab- или F(ab)₂-фрагментов эти изменения были менее выраженными. Эти опыты также указывают на существование взаимодействия между Fab- и Fc-частями молекулы IgG и соответствующих изменений в Fc-части после связывания антигена, который имеет достаточно большие размеры, чтобы заполнить полость активного центра. При добавлении небольшого по размерам гаптена конформационных изменений обнаружить не удается.

Большой интерес в связи с рассматриваемым вопросом о наличии конформационных изменений антител вызывают работы, которые указывают на возможность аллостерических кооперативных изменений между субъединицами молекул антител после связывания антигена.

Одна серия экспериментов, выполненная в лаборатории Кошленда (Brown, Koshland, 1975), основана на исследовании способности Fc-фрагмента к фиксации комплемента в результате связывания антителом антигена. В этих опытах использовали IgM-антитела против бета-лактозида. Сам по себе этот гаптен не индуцировал комплементсвязывающую активность. Только после присоединения к неспецифическому белковому носителю (РНКаза с одним гаптенем на моль) он приобрел способность вызывать такую активность. Поскольку такой антиген был моновалентен, то он не мог обусловить агрегацию или поперечную сшивку молекул IgM — антител, что, как известно, может явиться причиной активации системы комплемента. Другое объяснение, а именно, что функционирование определенных участков Fc-фрагментов зависит от конформационных изменений вследствие связывания антигена в активном центре, является более вероятным. Это объяснение предполагает наличие аллостерических свойств у иммуноглобулинов.

При изучении комплементактивирующей способности антител класса IgG было обнаружено, что она не может быть индуцирована теми конформационными изменениями Fab- и Fc-субъединиц, которые, судя по данным КДФ, сопровождают связывание моновалентного антигена. Однако реакция антитела с дивалентным антигеном (димер петлевого пептида лизоцима) придавала антителу способность активизировать комплемент. При этом специально проведенные эксперименты на аналитической ультрацентрифуге показали, что такая иммунная реакция, так же как и в опытах с моновалентным антигеном, не сопровождается образованием агрегатов. Авторы считают, что дивалентность антигена необходима для создания определенного соотношения углов между Fab- и Fc-фрагментами, при котором возможно экспонирование комплементсвязывающих участков (Pecht, 1977).

В других опытах исследовали способность кроличьих антител класса IgG связывать комплемент после реакции с антигенами в зависимости от размеров антигенов. Антитела получали иммунизацией кроликов пневмококковыми полисахаридами. Антигены представляли собой набор олигосахаридов, выделенных из исходного полисахарида путем его специальной обработки. В этой системе комплементсвязывающая активность иммунных комплексов проявлялась только тогда, когда размер сахарного олигомера увеличивался до 21-го сахарного остатка или более. Седиментационный анализ показал, что агрегаты, образованные комплексами антиген — антитело в этом случае содержат четыре и более молекул антител (Jaton et al., 1976). В таких агрегатах углы между Fab-субъединицами IgG варьируют от 90° до 180°, в то время как в

комплексах, неактивных по отношению к комплементу, угол между Fab-фрагментами был менее 60° .

Параллельно методом круговой поляризации флуоресценции была обнаружена корреляция между размерами олигосахаридного гаптена и величиной конформационных изменений в Fc.

Таким образом, можно заключить, что активация комплемента связывающих участков IgG происходит в результате комбинации индуцированных антигеном конформационных изменений субъединиц IgG и увеличения угла между Fab-фрагментами более чем на 90° . Возможно, что в IgM второе условие уже существует до связывания с антигеном, поэтому агрегация этих молекул неизбежна.

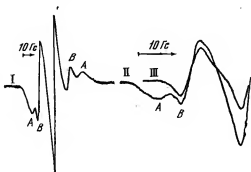
Состояние агрегации иммунных комплексов не должно препятствовать фиксации на Fc-фрагменте компонентов комплемента и, следовательно, их диффузии в преципитате. Изучение структуры специфического преципитата антител с антигенами было проведено с помощью спин-меток (Григорян и др., 1969). Для мечения белка использовали нитроксильный радикал, синтезированный на базе маленимида. Он ковалентно реагировал с SH-группами кроличьих антител после восстановления 2-меркаптоэтанолом межцепочечных дисульфидных связей. При этом активность антител сохранялась. В результате преципитации спин-меченых антител яичным альбумином метка продолжала вращаться свободно, не испытывая стерических препятствий. С другой стороны, неспецифическое осаждение спин-меченых антител сульфатом аммония приводило к сильной иммобилизации метки. Эти данные указывают на решетчатую, рыхлую структуру преципитата, образованного иммунными комплексами.

В опытах с применением метода кругового дихроизма были обнаружены различия в спектрах трех гомологичных антипневмококковых антител до и после их взаимодействия со специфичными гексасахаридными лигандами (Jaton e. a., 1975a). Исследовали также изменения в спектрах гомологичных и гибридных рекомбинантов H- и L-цепей под действием гаптена. Гомологичные рекомбинантные антитела имели спектр, идентичный спектру нативных антител, несмотря на отсутствие межцепочечных S—S-связей. Изменения в спектрах происходят при связывании гаптена во всех трех нативных антителах, их Fab-фрагментах и в гомологичных рекомбинантных молекулах. Однако не было обнаружено никаких признаков конформационных изменений после взаимодействия гаптена с гетерологичными рекомбинантными антителами. Эти результаты подтверждают изменение квантового выхода флуоресценции антител. Они указывают на высокую специфичность межцепочечных взаимодействий в иммуноглобулинах.

Уникальную информацию о взаимодействии доменов в цепях можно получать методом спиновой метки. Эта информация зависит от участка ее связывания белком. Соответствующий аминокислотный остаток (или остатки), с которым происходит связывание метки, определяется ее химической структурой и условиями мечения (например, pH). В нашей работе (Käiväräinen, Nezlin, 1967a) белки метили двумя иминоксильными радикалами: 2,2,6,6-тетраметил-4-амино-(N-дихлортриазолом) — R₁ и имидозолидом (2,2,5,5-тетраметил-1-оксипириролин-4-карбоновая кислота) — R₂. В зависимости от условий присоединения меток они могли связываться с остатками лизина или гистидина.

Рис. 13. Спектр ЭПР спин-меченных по гистидиновым остаткам димеров легких цепей (Käiväräinen, Nezlín, 1976a)

I — левая часть спектра в другом масштабе;
II, III — эта же часть спектра после триггерирующего расщепления спин-меченных легких цепей на домены;
A, B — микроокружения с различной микровязкостью



Спектр ЭПР меток R_1 и R_2 конъюгированных, вероятнее всего, с лизиновыми остатками белков, представлял собой три узкие линии, характерные для слабо иммобилизованной метки, не испытывающей стерических препятствий со стороны макромолекулы. В отличие от этих спектров спектры ЭПР иммуноглобулинов G, меченных по R_1 (предположительно присоединяющихся к гистидиновым остаткам), состоят из пяти компонент (рис. 13). Такие спектры указывают на способность метки находиться в двух различных микроокружениях — A и B, различающихся по микровязкости.

Сходство формы спектров ЭПР различных IgG и их субъединиц, по-видимому, обусловлено общими для всех них структурными элементами, а именно, доменами, и их взаимодействием (Käiväräinen и др., 1973; Käiväräinen, Nezlín, 1976b). Это предположение подтверждается тем, что у изолированных протеолизом доменов L-цепей, A-компоненты спектра, соответствующие более иммобилизованному состоянию метки, полностью исчезают (см. рис. 13). При этом важно отметить, что по данным физико-химических и иммунохимических методов половины L-цепей (домены) сохраняют свою основную пространственную структуру, свойственную им в составе нитатных L-цепей (Bjork e. a., 1971; Vengerova e. a., 1972).

В опытах по изучению взаимодействия спин-меченных R_1 по гистидиновым остаткам антител с антигенами использовали выделения кроличьи антитела против гемоглобина человека, против IgG быка и ослиные антитела против LgG человека (Käiväräinen и др., 1973; Käiväräinen, Nezlín, 1976b). В условиях нашего эксперимента спинные метки связывались в основном с Fab-фрагментами. Характер изменений спектров ЭПР спин-меченных антител при взаимодействии с антигенами не зависел от того, образовывался преципитат или нет.

Во всех исследованных случаях комплексообразование спин-меченных антител с антигенами приводило к увеличению отношения площади A-компонент к площади центральной компоненты по сравнению с контрольным спектром ЭПР. Кроме того, происходил сдвиг A-компонент, соответствующий увеличению иммобилизации метки в A-состоянии. Поскольку площадь A-компонент определяется количеством метки в этом состоянии, то ее увеличение означает увеличение количества метки в A-состоянии или увеличение времени жизни этого состояния.

Форма спектров ЭПР IgG и их субъединиц, спин-меченных R_1 , вероятно, по гистидиновым остаткам (см. рис. 13), может быть обусловлена следующими двумя причинами и их комбинацией.

1. Спектры являются результатом суперпозиции двух спектров, которые соответствуют двум различным участкам связывания метки с различным микроокружением.

2. Спектр ЭПР определяется способностью каждой метки находиться в двух различных микроокружениях. Такое объяснение предполагает способность Fab-фрагментов и димеров легких цепей изменять четвертичную структуру в процессе броуновского движения доменов. При этом А-компоненты спектра ЭПР соответствуют более компактному А-конформеру (метка иммобилизована), а В-компоненты соответствуют менее компактному В-конформеру (вращение метки более свободное).

Первое объяснение не является удовлетворительным, так как при взаимодействии спин-меченого антитела с антигеном происходит не только увеличение иммобилизации метки в А-состоянии, но и увеличение количества метки в этом состоянии.

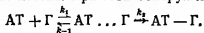
1.6. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛА С АНТИГЕНОМ

Описанные выше экспериментальные факты хорошо интерпретируются с помощью «конформерной модели». Достаточно допустить, что при взаимодействии активного центра с антигенной детерминантой в результате переориентации и стабилизации V-доменов происходит сдвиг равновесия между А- и В-конформерами Fab-фрагментов в сторону А-конформера и увеличение его компактности.

Указанием на правильность конформерной модели является исчезновение А-компонента спектра ЭПР спин-меченых L-цепей при их расщеплении пополам, т. е. при потере ими способности находиться в виде А-конформера.

Ранее нами была высказана гипотеза, что стабилизация и переориентация доменов под действием антигенной детерминанты индуцируют изменение характера относительного движения всех остальных доменов, входящих в состав молекулы IgG (Клявляйнен и др., 1973). Это должно приводить к изменению не только конформации Fab- и Fc-субъединиц, но и к изменению взаимодействия между субъединицами. Эта гипотеза в настоящее время находит подтверждение в цитированных выше работах с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния и метода круговой поляризации флуоресценции.

Правильность нашей интерпретации процессов, происходящих с молекулой IgG при образовании иммунного комплекса с антигеном, подтверждается также работами по изучению кинетики этой реакции. Исследовали интенсивность и поляризацию флуоресценции в процессе реакции между гаптеном флуоресцентном (Г) и гомологичным антителом (АТ) (Levison *et al.*, 1975) в статическом режиме и методом остановленного потока. При этом обнаружено, что процесс идет в два этапа:



Образование промежуточного комплекса $AT \dots G$ характеризуется константой скорости (k) второго порядка, происходит быстро и завершается через 0,3 сек после смешивания реагентов. Процесс $AT \dots G \rightarrow AT - G$ имеет константу скорости первого порядка и завершается пол-

ностью только через 60 мин. Второй этап объясняют медленным конформационным изменением молекулы антитела, которое может сопровождаться десорбцией воды. Интересно отметить, что нейтральные ионы увеличивают константу скорости ассоциации K_i в соответствии с рядом Гоффмейстера.

В работе по изучению кинетики взаимодействия миломного мономер IgA (MOPC 460) с ДНФ-Лиз (Lancet, Pecht, 1976) интерпретация результатов почти полностью совпадает с данной ранее нами для IgG. Авторы приходят к выводу, что молекула (MOPC 460) существует в виде двух конформеров и в свободном, и в связанном с гаптеном состоянии. Связывание гаптена меняет константу равновесия между конформерами. В упомянутой выше работе обнаружено две стадии реакции — быстрая и медленная, которые в соответствии с нашей моделью означают переориентацию и стабилизацию вариабельных доменов (первая стадия) и релаксационный процесс, приводящий к сдвигу равновесия между А и В-конформерами Fab-фрагментов в сторону компактного А-конформера (вторая).

Существуют данные, полученные различными методами, указывающие на повышение стабильности антител и их Fab-фрагментов в результате комплексования с гаптенами. Так, например, присоединение гаптена повышает устойчивость этих молекул к денатурирующему действию гуанидинхлорида (Cathou, Werner, 1970) и к действию химотрипсина (Grossberg et al., 1965).

Антитела класса IgM также стабилизируются специфическими гаптенами по отношению к протеолизу субтилизином и химотрипсином (Ashman, Metzger, 1971). При этом показано, что понижение чувствительности IgM к атакам протеаз полностью обусловлено изменением свойств Fab-фрагментов. Согласно нашей модели, гаптен сдвигает равновесие компонент А и В Fab-фрагмента влево. Поэтому для объяснения цитированных выше результатов достаточно допустить, что свободная энергия более компактного А-конформера ниже свободной энергии В-конформера (т. е. А-конформер стабильнее, чем В). Если это так, то повышение стабильности белка не должно зависеть от способа, которым соответствующий сдвиг равновесия вызывается. Действительно, было показано, что сдвиг влево равновесия А спин-меченых димеров легких цепей, моделирующих структуру Fab-субъединиц, под действием 1,2 М NaCl и 0,75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ увеличивает их стабильность по отношению к температуре. Аналогичный сдвиг равновесия между А- и В-конформерами вызывался и другими возмущающими структуру белка и его гидратной оболочки агентами, такими, как додецилсульфат натрия и температура.

Зависимость конформационного состояния IgG от температуры обнаружена и другими методами. Например, Г. В. Троицкий и сотрудники (1971) и И. Ф. Кирюхин и сотрудники (1972) методом дисперсии оптического вращения наблюдали рН-зависимый обратимый конформационный переход при изменении температуры от 27° до 38°. В дальнейшем было показано, что в области нейтральных рН температурный интервал перехода не зависит от изоэлектрической точки IgG. Однако при значении рН, далеком от изоэлектрической точки, когда молекула IgG приобретает достаточно большой собственный заряд, температурные конформационные переходы полностью отсутствуют (Troitsky et al., 1973). В работе В. П. Завьялова и сотрудников (Zavyalov et al., 1975) проведено

разностороннее исследование конформации меломного белка как функции pH и температуры методами дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма, пертурбационной спектроскопии, электрохимического йодирования и дифференциальной скапирующей микрокалориметрии. Было обнаружено, что при изменении pH от 6,0 до 6,5 доступность хромофорных групп для растворителя уменьшается. Это может быть следствием изменения количества заряженных групп в белке и уменьшения внутримолекулярных электростатических сил отталкивания. Аналогичное явление — экранирование части тирозиновых и триптофановых остатков (pH 7,35; 0,01 М фосфатный буфер) — наблюдали при повышении температуры от 25 до 35° С. Оно имеет место и при связывании динитрофенильного гаптена гомологичным кроличьим антителом (IgG). Эти результаты можно рассматривать как указания на то, что повышение температуры и образование специфических комплексов с гаптенами увеличивает их компактность, что согласуется с данными ряда цитированных выше работ.

Недавно нами предложен общий механизм ассоциации и диссоциации комплексов типа антитело — антиген или фермент — ингибитор, учитывающий динамические свойства белка и его взаимодействие с водой. В случае иммуноглобулинов считается, что активный центр и другие неполярные полости IgG между вариабельными и константными доменами Fab-фрагментов, между субъединицами IgG и между доменами Fc-фрагментов могут скачкообразно переходить из «открытого» состояния в «закрытое» и, наоборот, с вытеснением или сорбцией определенного количества воды. Соответствующие изменения свойств воды рассматриваются как переход, близкий к фазовому первого рода (т. е. без изменения свободной энергии, но со скачкообразным изменением энтальпии, энтропии и теплоемкости). Тем самым предполагаются высокая степень упорядоченности молекул воды в открытых белковых полостях и строгие требования к геометрии и свойствам полостей в таком состоянии. Разница в свободных энергиях воды, находящейся в открытой полости в неупорядоченном и квазикристаллическом состоянии, названа кластерфильным взаимодействием (Клявьярйнен, 1975а, б).

Ассоциация антигенной детерминанты с активным центром сопровождается разрушением упорядоченной структуры воды и ее вытеснением во внешнюю среду. Открытое состояние при этом дестабилизируется, а закрытое — стабилизируется нековалентными связями активного центра с детерминантой. Диссоциация представляет собой обратный процесс.

Таким образом, максимальная константа скорости ассоциации k_{+1} определяется частотой переходов активного центра из открытого состояния в закрытое. Если принять $K_{+1} \sim 10^8 \text{ М}^{-1}\text{сек}^{-1}$, то это означает, что в соответствии с уравнением Эйринга свободная энергия активации такого перехода активного центра около 6,5 ккал/моль.

Считается, что между состоянием белковых полостей существует взаимодействие. Поэтому быстрое изменение динамики поведения активного центра под действием антигена индуцирует релаксационный процесс, приводящий к аналогичным изменениям в характере флуктуаций остальных полостей IgG. Этот процесс сопровождается увеличением константы связывания лиганда, стабильности и компактности белка. Получены выражения, связывающие скорости ассоциации, диссоциации

и константу связывания с константами скоростей переходов активного центра и других полостей антитела из закрытого состояния в открытое, и наоборот. Следствия, вытекающие из них, находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными.

Иммуноглобулины к настоящему времени становятся одним из наиболее детально изученных белков и поэтому представляют собой весьма удобный объект для дальнейших исследований их свойств и функций, способствующих углублению знания физики белка в целом.

Литература

- Гамильтон К. Л., Мак-Коннел Г. М. Спиральные метки.— Усп. химии, 1970, 39, с. 531—559.
- Григорян Г. Л., Татарникова С. Г., Кульберг А. Я. и др. Применение иммуно-спинной парамагнитной метки для изучения иммунных γ -глобулинов.— Докл. АН СССР, 1968, 178, с. 230—233.
- Ингерм Д. Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М., «Мир», 1972.
- Кириухин И. Ф., Троцкий Г. В., Завьялов В. П. Обратимые температурные переходы фракций γ -глобулина с различными изоэлектрическими точками и их конформация при физиологических условиях.— Мол. биол., 1972, 6, с. 196—200.
- Кузнецов А. Н. Метод спинного зонда. М., «Наука», 1976.
- Куликов А. В. Определение расстояния между спинными метками и парамагнитного центра в спин-меченых белках по параметрам кривых насыщения спектра ЭПР метки при 77° К.— Мол. биол., 1976, 10, с. 132—141.
- Куликов А. В., Лихтенштейн Г. И., Розанцев Э. Г. и др. О возможности определения расстояния между функциональными группами белков методом парамагнитных меток.— Биофизика, 1972, 17, с. 4—48.
- Кокорин А. И., Замаев К. И., Григорян Г. Л. и др. Измерение расстояний между парамагнитными центрами в твердых растворах иминоксильных радикалов, биорадикалов и спин-меченых белков.— Биофизика, 1972, 17, с. 34—41.
- Клявьяринен А. И. Динамическая модель поведения белка в воде.— Биофизика, 1975а, 20, с. 967—971.
- Клявьяринен А. И. Раздельное определение собственных времен корреляции спин-меченых белков и связанных с ними меток.— Мол. биол., 1975б, 9, с. 805—811.
- Клявьяринен А. И., Незлин Р. С., Волькенштейн М. В. Расстояния между иминоксильными радикалами, локализованными в активных центрах антител и от-носительная свобода вращения их субъединиц.— Мол. биол., 1974, 8, с. 816—823.
- Клявьяринен А. И., Незлин Р. С., Лихтенштейн Г. И. и др. Конформационные изменения спин-меченных антител и антигенов при образовании специфических комплексов.— Мол. биол., 1973, 7, с. 760—770.
- Клявьяринен А. И., Тимофеев В. П., Волькенштейн М. В. Исследование конформационных свойств гемоглобина методом двух парамагнитных меток.— Мол. биол., 1972, 6, с. 875—881.
- Лихтенштейн Г. И. Определение топографии белковых групп методом специфических парамагнитных меток.— Мол. биол., 1968, 2, с. 234—240.
- Лихтенштейн Г. И. Метод спинных меток в молекулярной биологии. М., «Наука», 1974.
- Незлин Р. С. Современные представления о структуре антител.— Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1971, № 1, с. 44—49.
- Незлин Р. С. Строение и биосинтез антител. М., «Наука», 1972.
- Троцкий Г. В., Завьялов В. П., Кириухин И. Ф. Обратимые конформационные переходы γ -глобулинов в области температур, близких к физиологическим.— Биофизика, 1971, 16, с. 785—793.
- Франек Ф., Незлин Р. С. Изучение роли различных пептидных цепей антитела в реакции антиген—антитело.— Биохимия, 1963, 28, с. 193—200.
- Abaturov L. V., Nezlin R. S., Vengerova T. I., Varshavsky I. M. [Abaturov L. B., Nezlin R. S., Vengerova T. I., Varshavsky I. M.]. Conformational studies of immunoglobulin G and its subunits by the methods of hydrogen-deuterium exchange and infrared spectroscopy.— Biochim. Biophys. Acta, 1969, 194, p. 386—396.
- Ashman R. F., Kaplan A. P., Metzger H. A search for conformational change on ligand binding in a human M macroglobulin. I. Circular dichroism and hydrogen

- exchange.—*Immunochemistry*, 1971, 8, p. 627—641.
- Ashman R. F., Metzger H. A search for conformational changes of ligand binding in a human M macroglobulin. II. Susceptibility to proteolysis.—*Immunochemistry*, 1971, 8, p. 643—656.
- Bennich H., von Bahr-Lindström H. Structure of immunoglobulin E (IgE).—In: *Progress in Immunology*, 11, v. 1. L. Brent, J. Holborow (Eds). Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1974, p. 49—58.
- Björk I., Karlsson F. A., Berggård I. Independent folding of the variable and constant halves of a lambda immunoglobulin light chain.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1971, 68, p. 1707—1711.
- Brown J. C., Koshland M. E. Activation of antibody Fc function by antigen-induced conformational changes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, 12, p. 5111—5115.
- Cathou R. E., Holowka D. A., Chan L. M. Conformation and flexibility of immunoglobulins.—In: *Progress in Immunology*. V. 1. L. Brent, J. Holborow (Eds). Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1974, p. 63—73.
- Cathou R. E., Werner T. C. Hapten stabilization of antibody conformation.—*Biochemistry*, 1970, 9, p. 3149—3155.
- Colman P. M., Deisenhofer J., Huber R., Palm W. Structure of the human antibody molecule Kol (immunoglobulin G1): an electron density map at 5 Å resolution.—*J. Mol. Biol.*, 1976, 100, p. 257—282.
- Cser L., Gladkikh I. A., Koslov Zh. A. e. a. [Чер Л., Гладких И. А., Кослов Ж. А. и др.]. Neutron small-angle scattering studies of general structure of IgG molecule.—*FEBS Letters*, 1976, 68, p. 2283—2287.
- Davies D. R., Padlan E. A., Segal D. M. Three-dimensional structure of immunoglobulins.—*Annual Rev. Biochem.*, 1975a, 44, p. 639—667.
- Davies D. R., Padlan E. A., Segal D. M. Immunoglobulin structures at high resolution.—*Contemp. Topics Mol. Immunol.*, 1975b, 4, p. 127—155.
- Deisenhofer J., Colman P. M., Epp O., Huber R. Crystallographic structural studies of a human Fc-fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 Å resolution.—*Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1976a, 357, S. 1421—1434.
- Deisenhofer J., Colman P. M., Huber R. e. a. Crystallographic structural studies of a human Fc-fragment. I. An electron-density map at 4 Å resolution and a partial model.—*Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1976b, 357, S. 435—445.
- Dorrington K. J., Tanford C. Molecular size and conformation of immunoglobulins.—*Adv. Immunol.*, 1970, 12, p. 333—381.
- Dower S. K., Wain-Hobson S., Gettins P. e. a. The combining site of the dinitrophenyl-binding immunoglobulin A myeloma protein MOPC 315.—*Biochem. J.*, 1977, 165, p. 207—225.
- Dwerk R. A., Jones R., Marsh D. e. a. Antibody-hapten interactions in solution.—*Philos. Trans. Roy. Soc. London*, 1975a, B272, p. 53—73.
- Dwerk R. A., Knott J. C. A., Marsh D. e. a. Structural studies on the combining site of the myeloma protein MOPC 315.—*Europ. J. Biochem.*, 1975b, 53, p. 25—39.
- Edelman G. M. Antibody structure and molecular immunology.—*Science*, 1973, 180, p. 830—840.
- Epp O., Lattman E. E., Schiffer M. e. a. The molecular structure of a dimer composed of the variable portions of the Bence-Jones protein REI refined at 2.0 Å resolution.—*Biochemistry*, 1975, 14, p. 4943—4953.
- Feinstein A., Munn E. A. Conformation of the free and antigen-bound IgM antibody molecules.—*Nature*, 1969, 224, p. 1307—1310.
- Gally J. H. Structure of immunoglobulins.—In: *The Antigens*, v. 1. M. Sela (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1973, p. 161—298.
- Givol D., Pecht I., Hochman J., Schlessinger J. e. a. Conformational changes in the Fab and Fc of the antibody as a consequence of antigen binding.—In: *Progress in Immunology II*. V. 1. L. Brent, J. Holborow (Eds). Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1974, p. 39—48.
- Goldman S. A., Bruno G. V., Freed J. H. ESR studies of anisotropic rotational reorientation and slow tumbling in liquid and frozen media. II. Saturation and nonsecular effects.—*J. Chem. Phys.*, 1973, 59, p. 3071—3091.
- Grossberg A. L., Markus G., Pressman D. Change in antibody conformation induced by hapten.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, 54, p. 942—945.
- Hsia J. C., Little J. R. Alterations of antibody binding properties and active-site dimensions in the primary and secondary immune response.—*Biochemistry*, 1971, 10, p. 3742—3752.
- Hsia J. C., Little J. R. Structural properties of the ligand binding sites of murine myeloma proteins.—*FEBS Letters*, 1973, 31, p. 80—85.
- Hsia J. C., Piette L. H. Spin-labelled hapten studies of structure heterogeneity and cross-reactivity of the active site.—*Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 132, p. 466—469.
- Hsia J. C., Wong L. T. L., Kalow W. Homogeneous murine myeloma protein-315

- and spin-labelled DNP as a model system for spin-labelled hapten titration technique and spin immunoassay.—*J. Immunol. Methods*, 1973, 3, p. 17—24.
- Huber R. Antibody structure.—*Trends Biochem. Sci.*, 1976, 1, p. 174—178.
- Humphries G. H. K., McConnell H. M. Antibodies against nitroxide spin labels.—*Biophys. J.*, 1976, 16, p. 275—277.
- Jaton J.-C., Huser H., Blatt Y., Pecht I. Circular dichroism and fluorescence studies of homogeneous antibodies to type III pneumococcus polysaccharide.—*Biochemistry*, 1975a, 14, p. 5308—5312.
- Jaton J.-C., Huser H., Braun D. G. e. a. Conformational changes induced in a homogeneous anti-type III pneumococcal antibody by oligosaccharides of increasing size.—*Biochemistry*, 1975b, 14, p. 5312—5318.
- Jaton J.-C., Huser H., Riesen W. F. e. a. The binding of complement by complexes formed between a rabbit antibody and oligosaccharides of increasing size.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 1363—1366.
- Kabat E. A. Structural concepts in immunology and immunochemistry. N. Y., Holt, Rinehart and Winston, 1976.
- Käiväräinen A. I., Nezlín R. S. [Кяйвярййнен А. И., Незлин Р. С.]. Evidence for mobility of immunoglobulin domains obtained by spin-label method.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976a, 68, p. 270—275.
- Käiväräinen A. I., Nezlín R. S. [Кяйвярййнен А. И., Незлин Р. С.]. Spin label approach to conformational properties of immunoglobulins.—*Immunochemistry*, 1976b, 13, p. 1001—1008.
- Käiväräinen A. I., Nezlín R. S., Volkenstein M. V. [Кяйвярййнен А. И., Незлин Р. С., Волькенштейн М. В.]. Spin-spin interaction between iminoxyl radicals localized in antibody combining sites.—*FEBS Letters*, 1973, 35, p. 306—308.
- Karlsson F. A., Peterson P. A., Berggard I. A structural feature of human immunoglobulin L chains. Two compact domains connected by a small switch region.—*J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 1065—1070.
- Karush F. Immunologic specificity and molecular structure.—*Adv. Immunol.*, 1962, 2, p. 1—40.
- Karush F. Affinity and the immune response.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, 169, p. 56—66.
- Leute R. K., Ullman E. F., Goldstein A., Herzenberg L. A. A rapid new immunoassay technique: determination of morphine by electron resonance spectroscopy.—*Nature*, 1972, 236, p. 93—96.
- Levison S. A., Hicks A. N., Portmann A. J., Dendliker W. B. Fluorescent polarization and intensity kinetic studies of antiluorescein antibody obtained at different stages of the immune response.—*Biochemistry*, 1975, 14, p. 3778—3786.
- McConnell H. M., McFarland B. G. Physics and chemistry of spin labels.—*Quart. Rev. Biophys.*, 1970, 3, p. 91—136.
- Meizger H. The effect of antigen on antibodies: recent studies.—*Contemp. Topics Mol. Immunol.*, 1978, 7, p. 150—170.
- Nezlin R. S., Zagayansky Y. A., Tumerman L. A. [Незлин Р. С., Загянский Ю. А., Тумерман Л. А.]. Strong evidence for the freedom of rotation of immunoglobulin G subunits.—*J. Mol. Biol.*, 1970, 50, p. 569—574.
- Nezlin R. S., Zagayansky Y. A., Tumerman L. A. [Незлин Р. С., Загянский Ю. А., Тумерман Л. А.]. The flexibility of antibody molecule.—*Haematologia*, 1972, 3, p. 313—315.
- Nezlin R. S., Zagayansky Y. A., Käiväräinen A. I., Stefani D. V. [Незлин Р. С., Загянский Ю. А., Кяйвярййнен А. И., Стефани Д. В.]. Properties of myeloma IgE (Yu). Chemical, fluorescence polarization and spin-labelled studies.—*Immunochemistry*, 1973, 10, p. 681—688.
- Nisonoff A., Hopper J. E., Spring S. B. The antibody molecule. N. Y., Acad. Press, 1975.
- Padlan E. A., Davies D. R., Pecht I. e. a. Model building studies of antigen binding sites: the hapten binding site of MOPC 315.—*Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1977, p. 627—638.
- Padlan E. A., Segal D. M., Cohen G. H., Davies D. R. The three dimensional structure of the antigen binding site of McPC 603 protein.—In: The immune system, genes, receptors, signals. E. E. Sercarz, A. R. Williamson, C. F. Fox (Eds). N. Y., Acad. Press, 1974, p. 7—14.
- Pecht I. Antibody combining sites as a model for molecular recognition.—In: Protein-ligand interactions. West Berlin, Walter de Gruyter, 1976, p. 356—366.
- Plette L. H., Hsia J. C., Kosman D. J., Spallholz J. F. Spin-labelled antibodies.—1st Europ. Biophys. Congr., Wien, 1971, p. 113.
- Piette L. H., Kiefer E. F., Grossberg A. L., Presman D. Spinlabel studies of combining sites in antibodies to charged haptens.—*Immunochemistry*, 1972, 9, p. 17—22.
- Pilz I., Kratky O., Karush F. Changes of the conformation of rabbit IgG antibody caused by the specific binding of a hapten. X-ray small angle studies.—*Europ. J. Biochem.*, 1974, 41, p. 91—96.
- Pilz I., Kratky O., Licht A., Sela K. Shape and volume of antipoly (d-alanyl) antibodies in the presence and absence of tetra-d-alanine as followed by small-angle X-ray scattering.—*Biochemistry*, 1973, 12, p. 4998—5005.

- Poljak R. J. X-ray diffraction studies of immunoglobulins.—*Adv. Immunol.*, 1975, 21, p. 1—33.
- Poljak R. J., Amzel L. M., Chen B. I. e. a. The three dimensional structure of Fab' fragment of a human myeloma immunoglobulin at 2.0 Å resolution.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, 71, p. 3440—3444.
- Porter R. R. Structural studies of immunoglobulins.—*Science*, 1973, 180, p. 713—720.
- Putman F. W. Immunoglobulin structure: variability and homology.—*Science*, 1969, 163, p. 633—640.
- Romans D. G., Tilley C. A., Crookstone M. C. e. a. Conversion of incomplete antibodies to direct agglutinins by mild reduction.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, 74, p. 2531—2535.
- Schiffner M., Girling R. L., Ely K. R., Edmondson A. B. Structure of a lambda-type Bence-Jones protein at 3.5 Å resolution.—*Biochemistry*, 1973, 12, p. 4620—4626.
- Schlessinger J., Steinberg I. Z., Givol D., Hochman J. Subunit interaction in antibodies and antibody fragments studies by circular polarization of fluorescence.—*FEBS Letters*, 1975a, 52, p. 231—235.
- Schlessinger J., Steinberg I. Z., Givol D. e. a. Antigen-induced conformational changes in antibodies and their Fab fragments studied by circular polarization of fluorescence.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975b, 72, p. 2775—2779.
- Segal D. M., Padlan E. A., Cohen C. H. e. a. The three-dimensional structure of a phosphorylcholine-binding mouse immunoglobulin Fab and the nature of the antigen-binding site.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, 71, p. 4298—5003.
- Sela M. Structure and specificity of synthetic polypeptide antigens.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, 169, p. 23—33.
- Shimshick E. J., McConnell H. M. Rotational correlation time of spin-labeled alpha-chymotrypsin.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, p. 321—327.
- Singer S. J., Martin M., Thorpe N. O. Affinity labelling of the active sites of antibodies and myeloma proteins.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, 190, p. 342—351.
- Spin labelling: theory and applications. Berliner L. J. (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1976.
- Stone T. J., Buchman T., Nordio P. L., McConnell H. M. Spinlabelled biomolecules.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, 54, p. 1010—1017.
- Stryer L., Griffith O. H. A spin-labelled hapten.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, 54, p. 1785—1789.
- Taylor J. C., Leigh J. S., Cohn M. Magnetic resonance studies of spin-labelled creatine kinase system and interaction of two paramagnetic probes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1969, 64, p. 319—326.
- Thomas D. D., McConnell H. M. Calculation of paramagnetic resonance spectra sensitive to very slow rotational motion.—*Chem. Phys. Letters*, 1974, 25, p. 470—475.
- Troitsky G. V., Zavyalov V. P., Kiryukhin I. F. [Троицкий Г. В., Завьялов В. П., Кирюхин И. Ф.]. Temperature dependence of protein conformation using IgG fractions with different isoelectric points and myeloma IgG.—*Biochim. biophys. acta*, 1973, 322, p. 53—61.
- Valentine R. C., Green N. M. Electron microscopy of an antibody-hapten complex.—*J. Mol. Biol.*, 1967, 27, p. 615—619.
- Vengerova T. I., Rokhlin O. V., Nezlin R. S. [Венгерова Т. И., Рохлин О. В., Незлин Р. С.]. Retention of complete antigenic activity of L-chains of rat Ig after their splitting into halves.—*Immunochemistry*, 1972, 9, p. 413—420.
- Willan K. J., Marsh D., Sunderland C. A. e. a. Comparison of the dimensions of the combining sites of the dinitrophenyl-binding immunoglobulin A myeloma proteins MOPC 315, MOPC 460, and XRPC 25 by spin-label mapping.—*Biochem. J.*, 1977, 165, p. 199—206.
- Wong L. T. L., Piette L. H., Little J. R., Hsia J. C. Stereospecificity of murine myeloma protein 315 to enantiomeric spin-labelled DNP hapten.—*Immunochemistry*, 1974, 11, p. 377—379.
- Wu T. T., Kabat E. A. An analysis of the sequence of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma L. chains and their implications for antibody complementarity.—*J. Exptl Med.*, 1970, 132, p. 211—219.
- Yguerabide J., Epstein H. F., Stryer L. Segmental flexibility in an antibody molecule.—*J. Mol. Biol.*, 1970, 51, p. 537—583.
- Zagayansky Y. A., Nezlin R. S., Tuzerman L. A. [Загайанский Ю. А., Незлин Р. С., Тумерман Л. А.]. Flexibility of IgG molecules as established by fluorescent polarization measurements.—*Immunochemistry*, 1969, 6, p. 787—797.
- Zavyalov V. P., Troitsky G. V., Demchenko A. P., Generalov I. V. [Завьялов В. П., Троицкий Г. В., Демченко А. П., Генералов И. В.]. Temperature and pH changes of immunoglobulin G structure.—*Biochim. biophys. acta*, 1975, 386, p. 155—167.

ГЕНЕТИКА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Исследования в области генетической регуляции биосинтеза иммуноглобулинов привели к принципиально новым открытиям, имеющим первостепенное значение не только для иммунологии, но и для молекулярной биологии и генетики. В настоящем обзоре рассмотрена организация генетического материала, контролирующего образование полипептидных цепей иммуноглобулинов у млекопитающих.

II.1. АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Антигенные свойства иммуноглобулинов послужили темн фенотипическими признаками, изучение которых позволило установить закономерности генетической регуляции биосинтеза иммуноглобулинов. Любая молекула иммуноглобулина обладает, по-видимому, той или иной анти-тельной специфичностью, т. е. способна взаимодействовать с чужеродными для данного организма веществами — антигенами. Однако и сама молекула иммуноглобулина способна выступать в роли антигена в тех случаях, когда иммуноглобулины одного вида (например, человека) вводятся особям другого вида (например, кролика).

Различают три типа антигенных детерминант молекул иммуноглобулина: изотипы, аллотипы, идиотипы (Natvig, Kunkel, 1973).

Изотипическими антигенными детерминантами являются те участки молекул иммуноглобулинов, антигенные свойства которых идентичны у всех особей данного вида.

Каждый класс иммуноглобулинов имеет свои, характерные только для данного класса, изотипические антигены, которые локализованы на постоянной области тяжелых цепей. Изотипические детерминанты, характерные для легких цепей каппа- и ламбда-типа, также локализованы на постоянной области цепи. Разные классы иммуноглобулинов и разные типы легких цепей не имеют общих антигенных детерминант, несмотря на наличие гомологичных последовательностей.

Однако подклассы иммуноглобулинов имеют как общие для разных подклассов антигенные детерминанты, так и детерминанты, специфичные только для данного подкласса.

К аллотипическим антигенным детерминантам (аллотипам) относятся те антигенные детерминанты молекул иммуноглобулинов, которые имеются у одних особей данного вида и отсутствуют у других, и эти различия определяются аллельными генами. Наличие аллотипов является отражением внутривидового полиморфизма в антигенном строении молекул иммуноглобулинов.

И, наконец, третий тип антигенных детерминант — это идиотипические детерминанты (идиотипы). К идиотипам относятся те индивидуальные

антигенные свойства, которые присущи только молекулам антител данной специфичности или индивидуальным миеломным иммуноглобулинам. Антигенная специфичность иднотипов зависит от строения вариабельной области молекулы антитела, и в ряде случаев имеются определенные доказательства, что иднотипы являются отражением антигенных свойств активного центра молекулы антитела.

Антитела к изотипическим детерминантам используются для идентификации различных классов и подклассов иммуноглобулинов и типов легких цепей. Антитела же к аллотипам служат для обнаружения генетических вариантов иммуноглобулинов, причем аллотипические маркеры локализованы, как правило, на постоянной части полипептидных цепей иммуноглобулинов. Что же касается иднотипических детерминант, то их локализация на вариабельной части молекулы иммуноглобулина позволяет их использовать в качестве генетических маркеров вариабельной части.

История обнаружения генетических маркеров полипептидных цепей иммуноглобулинов вкратце такова. Уже давно было известно, что в сыворотке больных ревматоидным артритом часто содержатся так называемые агглютинаторы, которые способны специфически взаимодействовать с аутологичным IgG. Для обнаружения агглютинаторов используются эритроциты людей Rh⁺, покрытые неполными анти-Rh-антителами, т. е. антителами, которые неспособны агглютинировать эритроциты. Агглютинация наступает только после добавления агглютинатора, способного взаимодействовать с анти-Rh-антителами на поверхности эритроцитов.

В 1956 г. Грубб (Grubb, 1956) обнаружил, что сыворотки части здоровых людей способны предотвращать эту агглютинацию, тогда как сыворотки других людей не обладают такой активностью. Анализ большого числа семей показал, что эти различия наследуются моногибридно. Фактор, предотвращающий агглютинацию, оказался одним из вариантов иммуноглобулина и был назван Gm. Позднее был открыт другой тормозящий фактор, неаллельный Gm, получивший название InV (Ropartz et al., 1961). Именно так были обнаружены внутривидовые антигенные различия в строении иммуноглобулинов человека, т. е. аллотипы. Локализация аллотипических антигенных детерминант на молекуле иммуноглобулина позволили затем разбить их на две группы — Gm и InV, так как оказалось, что Gm-аллотипы локализованы на тяжелых цепях молекул иммуноглобулинов человека, а InV-аллотипы — на легких цепях.

В том же 1956 г. были обнаружены и внутривидовые различия в антигенных свойствах иммуноглобулинов кролика (Oudin, 1956). В этом случае аллотипы были обнаружены не с помощью аутоантител (агглютинаторов), а с помощью перекрестной внутривидовой иммунизации. Для этого иммуноглобулины, выделенные из сыворотки одного кролика, вводили другому кролику и, если между иммуноглобулинами этих двух животных существовали антигенные различия, то у кролика-реципиента вырабатывались антитела, специфически реагирующие с иммуноглобулинами кролика-донора. С помощью перекрестной внутривидовой иммунизации были обнаружены также и аллотипы иммуноглобулинов мыши и крысы, но здесь задача облегчалась наличием большого числа инбредных линий животных (Herzenberg, 1964; Рохлин и др., 1970).

Таким образом, основной метод обнаружения наследственных внутривидовых различий в антигенном строении иммуноглобулинов состоит в получении тем или иным способом моноспецифических антител, которые реагируют с иммуноглобулинами только некоторых (но не всех) особей в пределах данного вида. Характер наследования обнаруженных различий изучается затем с помощью обычного гибридологического анализа.

Чрезвычайно важным этапом в изучении аллотипов является локализация аллотипических детерминант на молекуле иммуноглобулина. Сама молекула иммуноглобулина состоит из двух типов цепей, и каждая полипептидная цепь, кроме того, состоит из двух частей — вариабельной и постоянной. Иммуноглобулины являются также семейством белков, состоящим из разных классов и подклассов. Именно поэтому выяснение локализации генетических маркеров на молекуле иммуноглобулина является необходимым этапом в изучении генетической регуляции биосинтеза этих белков, так как это позволяет прийти к определенным выводам о том, одни и те же или разные гены контролируют образование разных классов и подклассов, разных типов полипептидных цепей и разных частей одной полипептидной цепи.

В соответствии с характером структурной гетерогенности иммуноглобулинов генетические аспекты биосинтеза иммуноглобулинов рассмотрены вначале отдельно для постоянных и вариабельных частей легких и тяжелых полипептидных цепей, и затем дана общая схема организации генетического материала, контролирующего образование полипептидных цепей иммуноглобулинов.

II.2. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПОСТОЯННОЙ ОБЛАСТИ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ (C_L-ГЕНЫ)

Генетические варианты легких цепей обнаружены для иммуноглобулинов человека, кролика и крысы. Известны четыре аллотипических варианта легких цепей иммуноглобулинов человека. Многочисленные данные о распределении этих вариантов в семьях, а также популяционные исследования различных рас показали, что эти варианты контролируются серией множественных аллелей одного локуса (Muir, Steinberg, 1967).

Локус, контролирующий образование легких цепей иммуноглобулинов человека, получил название InV-локуса, а соответствующие аллельные варианты — InV1; InV1, 2; InV3 и InV(—).

InV-аллотипы обнаружены во всех классах иммуноглобулинов, так как легкие цепи являются общими для всех классов. Но из двух типов легких цепей (каппа и ламбда) InV-аллотипы обнаружены только на легких цепях каппа-типа (табл. 3). Аллельные варианты для легких цепей ламбда-типа неизвестны. Однако отсутствие маркеров InV-локуса на ламбда-цепях указывает на то, что образование каппа- и ламбда-цепей должно контролироваться разными локусами.

Постоянная часть легкой цепи начинается с остатка 107 или 108, и, следовательно, InV-маркеры являются маркерами постоянной области легкой цепи. Обращает на себя внимание также факт, что только одна аминокислотная замена определяет различия между аллельными

Таблица 3

Структурные различия между аллельными вариантами каппа-цепей иммуноглобулинов человека (Milstein e. a., 1974)

InV-вариант	Положение аминокислотного остатка	
	153-е	191-е
1, 2, —3	Ала	Лей
—1, —2, 3	Ала	Вал
1, —2, —3	Вал	Лей

вариантами InV-локуса. Однако даже одиой замены достаточно для изменения антигенных свойств полипептидной цепи, и в отношении каждого из аллельных вариантов могут быть получены моноспецифические антитела, которые реагируют только с данным вариантом, но не с другими.

Внутривидовой полиморфизм легких цепей каппа-типа иммуноглобулинов человека имеет достаточно давнее эволюционное происхождение, так как InV1- и InV3-варианты обнаружены у шимпанзе, а InV1-вариант обнаружен у бабунов (Milstein e. a., 1974).

Генетические варианты ламбда-цепи человека не обнаружены, но в отличие от каппа-цепей легкие цепи ламбда-типа состоят из четырех различных изоформ. Все изоформы имеются у каждого индивидуума (табл. 4), т. е. наличие изоформ ламбда-цепей не является отражением внутривидового полиморфизма (Gibson e. a., 1971; Hess e. a., 1971; Fett, Deutsch, 1975).

Таблица 4

Структурные различия между изоформами ламбда-цепей иммуноглобулинов человека

Изотип ламбда-цепи	Положение аминокислотного остатка				
	116	118	154	167	191
Kern -Oz-	Ала	Сер	Сер	Тре	Арг
Kern -Oz+	Ала	Сер	Сер	Тре	Лиз
Kern +Oz-	Ала	Сер	Гли	Тре	Арг
Mcg	Асп	Вал	Гли	Лиз	Арг

Если различия между первыми тремя изоформами ламбда-цепей человека определяются заменой только одного аминокислотного остатка, то вариант Mcg отличается от любого изоформа Kern Oz по трем аминокислотным остаткам (Fett, Deutsch, 1975). Чрезвычайно интересен тот факт, что аминокислотные остатки, определяющие различия между аллельными вариантами каппа-цепей, локализованы на полипептидной цепи в тех же положениях, что и остатки, определяющие различия между изоформами Kern Oz ламбда-цепи. Рентгеноструктурный анализ легких цепей показал, что аминокислотные остатки в положениях 153 и 191 расположены очень близко друг к другу, находясь на поверхности молекулы в соседних петлях полипептидной цепи (Poljak e. a., 1976), расстояние между которыми составляет примерно 8 Å (см. рис. 6). Эти данные позволяют объяснить, почему аминокислотные замены в одних и

тех же положениях у каппа- и ламбда-цепей приводят к изменению антигенной специфичности полипептидной цепи. Однако остается совершенно неясным, в силу каких причин аминокислотные различия в положениях 153 и 191 каппа-цепей реализованы в виде внутривидового полиморфизма и контролируются серией аллелей одного локуса, тогда как структурные различия в тех же самых положениях ламбда-цепи реализованы в виде изоформ и, вероятнее всего, контролируются различными неаллельными генами.

Аллельные варианты легких цепей иммуноглобулинов кролика известны как для каппа-, так и для ламбда-цепей. Для каппа-цепей известны четыре аллельных варианта. Локус, контролирующий образование каппа-цепей, обозначается буквой «b», а аллельные варианты — b4, b5, b6 и b9. Локус ламбда-цепей обозначают буквой «с», и для с-локуса известны два аллельных варианта: c7 и c21 (Gilman-Sachs *et al.*, 1969).

Гибридологический анализ показал, что гены каппа- и ламбда-цепей иммуноглобулинов кролика распределяются в потомстве независимо один от другого, и, следовательно, b- и с-локусы расположены на различных хромосомах.

В отличие от аллельных вариантов каппа-цепей иммуноглобулинов человека различия между аллельными вариантами каппа-цепей иммуноглобулинов кролика обусловлены множественными аминокислотными заменами. Так, постоянная область варианта b9 отличается от таковой варианта b4 по 33 остаткам из 103 и, кроме того, в постоянной области цепей b9 имеются три делеции в положениях 109, 141 и 189. Из 33 аминокислотных различий девять обусловлены заменой двух оснований в кодоне (Farnsworth *et al.*, 1976).

Подобный размах внутривидовых различий в строении каппа-цепей иммуноглобулинов кролика вызывает удивление. Например, постоянные области каппа-цепей иммуноглобулинов человека и мыши различаются по 40% аминокислотных остатков, а филогенетическое расстояние между этими видами составляет 75 млн лет, в то же время в пределах одного и того же вида каппа-цепи иммуноглобулинов кролика различаются по 35% аминокислотных остатков.

Множественные аминокислотные различия обнаружены и между аллельными вариантами каппа-цепей иммуноглобулинов крысы (Vengrova *et al.*, 1972; Gutman *et al.*, 1975). В этом случае каппа-цепи различаются по 10 остаткам и одной делеции. Распределение положений, где наблюдаются аминокислотные замены, неслучайно по отношению к трехмерной структуре постоянной области каппа-цепей иммуноглобулинов крысы. Большая часть этих положений локализована на наружной части цепи, причем различия в положениях 153 и 155, с одной стороны, и в положениях 184, 185 и 188 — с другой, пространственно аналогичны тем положениям, где наблюдаются замены между аллельными вариантами каппа-цепей человека и изоформами ламбда-цепей.

Различия между каппа-цепями иммуноглобулинов крысы не так велики, как между аллельными вариантами каппа-цепей кролика, но и в случае каппа-цепей крысы размах внутривидовых различий не укладывается в традиционный филогенетический ряд. Так, между постоянной областью каппа-цепей иммуноглобулинов мыши и крысы выявлено 26 аминокислотных замен, а между аллельными вариантами каппа-цепей крысы таких замен 11 (Gutman *et al.*, 1975).

Таким образом, структурные и генетические исследования постоянной области легких полипептидных цепей иммуноглобулинов человека, кролика и крысы показали следующее: 1) существуют наследственные внутривидовые различия в строении постоянных областей легких полипептидных цепей, и образование постоянной области контролируется соответствующими генами; 2) в случае легких цепей иммуноглобулинов человека различия между аллельными вариантами определяются заменой одного аминокислотного остатка, тогда как между аллельными вариантами легких цепей иммуноглобулинов кролика и крысы наблюдаются множественные аминокислотные замены; 3) образование постоянной области легких цепей каппа- и ламбда-типа контролируется разными несцепленными генами.

II.3. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ (V_L-ГЕНЫ)

Структурные и генетические исследования иммуноглобулинов привели к весьма существенному выводу, который имеет значение не только для иммунологии, но и для молекулярной биологии в целом. Так, ставшее уже классическим утверждение «один ген — одна полипептидная цепь» в случае иммуноглобулинов оказалось неверным. Существуют веские данные в пользу того, что образование одной полипептидной цепи иммуноглобулинов находится под контролем двух разных генов: V-генов, контролирующих образование вариабельной области полипептидной цепи, и C-генов, контролирующих образование постоянной области.

Многобридное наследование аллельных маркеров, локализованных в постоянной области легких цепей, указывает на то, что у одной особи не должно быть более двух соответствующих генов. В то же время установлено, что данный аллельный вариант постоянной области легкой цепи, например: InV1 или InV3 — может находиться в составе одной полипептидной цепи с любой из подгрупп вариабельных областей (Milstein, 1969). В пределах данного типа легких цепей существует несколько вариабельных подгрупп, и эти подгруппы имеются у всех особей данного вида. Если бы строение всей полипептидной цепи определялось одним геном, то у каждой особи должно было бы быть во всяком случае несколько генов, идентичных в одной своей половине и различных в другой. Однако очевидно, что несколько абсолютно идентичных генов не могли бы длительно сохраниться в процессе эволюции, так как неизбежно должен был бы идти процесс их дивергенции. Эти соображения и заставили предположить, что одна полипептидная цепь иммуноглобулинов кодируется двумя разными генами (Hiltschmann, Craig, 1965).

Число генов, контролирующих образование вариабельных областей легкой цепи, неизвестно, но их должно быть по крайней мере столько же, сколько существует подгрупп вариабельных частей. На это указывают прежде всего те дискретные различия в первичной структуре, которые существуют между различными вариабельными подгруппами.

Структурные различия между вариабельными подгруппами достигают 50%, тогда как в пределах подгруппы вариабельные половины

легких цепей различаются не более чем на 15%. Кроме того, для каждой вариабельной подгруппы имеются делеции и вставки, которые характерны для легких цепей данной подгруппы. В пределах каждой подгруппы наблюдается также определенное сочетание аминокислотных остатков, которое в других вариабельных подгруппах не встречается (Hood, 1973).

Наблюдающиеся закономерности в строении вариабельных частей легких цепей нельзя объяснить исходя из предположения, что существует только один V_L -ген, а все многообразие последовательностей вариабельных областей возникает в процессе индивидуального развития, в результате соматических мутаций этого единственного передающегося по наследству гена. Гаметически наследующихся генов должно быть по крайней мере столько же, сколько имеется нормальных легких цепей.

Различия между вариабельными подгруппами легких цепей иммуноглобулинов кролика можно выявить уже по первому NH_2 -концевому остатку (Hood *е. а.*, 1970). Если одну из трех обнаруженных вариабельных подгрупп взять в качестве нормы (V_{LII} -подгруппу), то легкие цепи V_{KI} -подгруппы будут иметь добавочный NH_2 -концевой остаток, а легкие цепи V_{KIII} -подгруппы будут иметь NH_2 -концевую делецию. Эта закономерность была выявлена при изучении структуры легких цепей гомогенных антител. Но при изучении пула нормальных легких цепей были обнаружены последовательности аминокислотных остатков, характерные для каждой из подгрупп. Важно отметить, что эти вариабельные подгруппы обнаружены у всех изученных особей, и, следовательно, их образование контролируется неаллельными генами.

Дальнейший анализ первичной структуры легких цепей, выделенных из большого числа гомогенных антител кролика к бактериальным полисахаридам, показал, что легкие цепи каппа-типа можно разбить на шесть вариабельных подгрупп (Braun, Jaton, 1973). Интересно то, что вариабельная подгруппа, характерная для антител данного кролика, оставалась той же самой и у части потомков этого кролика, иммунизированных тем же антигеном. Особое внимание привлекает наследование вариабельной подгруппы V_{KVI} легких цепей иммуноглобулинов кролика. Содержание V_{KVI} -подгруппы среди нормальных легких цепей составляет только 3%. Обнаружен один кролик, способный продуцировать большое количество гомогенных антител к полисахариду стрептококка, и легкие цепи антител этого кролика относились к V_{KVI} -подгруппе. От этого кролика было получено потомство, среди которого проведен отбор по способности к «сильному» и «слабому» иммунному ответу. Оказалось, что легкие цепи антител кроликов с сильным типом иммунного ответа к полисахариду стрептококка имеют ту же вариабельную подгруппу V_{KVI} , что и кролик-родитель. Результаты этих опытов, безусловно, указывают на то, что наличие вариабельных подгрупп легких цепей иммуноглобулинов является наследственным признаком, а не генерируется в результате соматических мутаций в лимфоидных клетках.

Аналогичные данные получены при исследовании легких цепей антител, выделенных из иммунной сыворотки другого кролика. В этом случае определенный структурный вариант вариабельной части легкой цепи наследовался на протяжении пяти последовательных поколений (Sogge *е. а.*, 1976).

Наследственный характер особенностей строения вариабельной части легких цепей иммуноглобулинов мыши был выявлен при изучении пептидных карт легких цепей иммуноглобулинов линии AKR и DBA. Оказалось, что у мышей AKR имеется пептид, обозначенный I_B, который отсутствует у DBA. Этот пептид локализован в вариабельной части легких цепей, а именно в участке 19—24, и составляет 10% от общего количества пептидов в этом участке. Наличие или отсутствие этого пептида наследуется моногибридно, и, следовательно, образование соответствующей вариабельной области контролируется аллелями одного локуса (Edelman, Gottlieb, 1970).

Затем было установлено, что I_B является маркером вариабельной области каппа-цепей мыши и сцеплен с локусом Ly-3, локализованным на 6-й хромосоме мыши и определяющим некоторые антигенные свойства тимоцитов (Gottlieb, 1974). Обнаружены также наследственные различия в изоэлектрофоретических свойствах легких цепей мыши, обусловленные, вероятно, различиями в строении их вариабельной области (Gibson, 1976).

Таким образом, строение по крайней мере некоторых вариабельных областей легких полипептидных цепей определяется гаметически наследующимися V-генами.

Прямые экспериментальные данные о характере сцепления V- и C-генов легких цепей отсутствуют. Однако установлено, что вариабельные области ламбда-цепей всегда находятся в составе одной полипептидной цепи только с постоянной областью ламбда-типа, а вариабельные области каппа-цепей — с постоянной областью каппа-типа. Отсутствие молекулярных гибридов V-ламбда—C-каппа и V-каппа—C-ламбда указывает на то, что V- и C-гены данного типа легких цепей должны быть расположены на одной хромосоме (напомним, что C-гены каппа- и ламбда-цепей не сцеплены).

Исследование продуктов трансляции мРНК легких цепей в условиях бесклеточной системы показало, что размер V_L-генов больше, чем до сих пор предполагалось (Burstein e. a., 1976; Schechter e. a., 1976).

Длина вариабельной области легких цепей составляет 107—108 остатков, но таков размер вариабельной области тех легких цепей, которые выделены из сыворотки или из клеток, где они синтезированы. Если же мРНК легких цепей транслировать в условиях гетерологичной бесклеточной системы (например, из проростков пшеницы), то оказывается, что вариабельная область содержит на 20—22 остатка больше и этот дополнительный участок непосредственно соединен с NH₂-концевым остатком легкой цепи. Этот дополнительный участок назвали экстраучастком, легкая цепь, имеющая экстраучасток, носит название незрелой, а легкую цепь без экстраучастка называют зрелой. Вопрос, который прежде всего подвергся исследованию, состоит в следующем: является ли экстраучасток общим для всех легких цепей или же легкие цепи, относящиеся к разным вариабельным подгруппам (т. е. контролируемые разными V_L-генами), имеют разные экстраучастки и, следовательно, V_L-гены имеют больший размер, чем до сих пор предполагалось. Исследование экстраучастков трех различных каппа-цепей мыши, две из которых относились к одной и той же вариабельной подгруппе, показало, что в пределах одной подгруппы экстраучастки идентичны как по длине, так и по последовательности, тогда как экстраучастки легких цепей разных вариабельных подгрупп различаются и по длине

(20 и 22 остатка), и по последовательности (60% идентичных остатков). Экстраучасток ламбда-цепей мыши содержит 18 остатков и отличается по последовательности от экстраучастка любой из каппа-цепей.

Таким образом, V_L -гены имеют большие размеры, чем это следует из исследования первичной структуры зрелых легких цепей. Вероятно, в клетках существуют ферменты, которые быстро отщепляют экстраучасток от вновь синтезированных легких цепей, так как незрелые легкие цепи из гомологичных клеток выделить не удастся.

Экстраучастки имеют характерные структурные особенности, которые не встречаются у зрелых легких цепей. NH_2 -концевым остатком всех экстраучастков является метионин, и, вероятно, именно он является инициаторным. В пределах экстраучастка содержится около 75% гидрофобных остатков (в основном остатки Лей) и короткие повторяющиеся участки: в одном случае — Лей-Лей-Лей-Тре-Вал и в другом — Фен-Лей-Лей.

Предполагается, что гидрофобность экстраучастка позволяет небольшой части незрелых легких цепей локализоваться в пределах плазматической мембраны, где они могут выполнять роль антигенраспознающих рецепторов.

Подводя итог рассмотрению вопроса о структурных генах легких цепей, подчеркнем следующие основные положения: 1) переменные половины легких цепей иммуноглобулинов контролируются гаметически наследующимися V_L -генами, и этих генов должно быть по крайней мере столько же, сколько известно переменных подгрупп; 2) генетические маркеры, локализованные на постоянной половине легкой цепи, наследуются моногибридно и, следовательно, C_L -генов должно быть немного, во всяком случае существенно меньше, чем V_L -генов; 3) структурные и генетические исследования легких цепей иммуноглобулинов приводят к выводу, что образование одной полипептидной цепи контролируется двумя разными генами — V_L и C_L ; 4) V - и C -гены, контролирующие образование данного типа легких цепей, сцеплены, т. е. V_κ -гены сцеплены с C_κ , а V_λ -гены сцеплены с C_λ -генами.

II.4. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПОСТОЯННОЙ ОБЛАСТИ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ (C_H -ГЕНЫ)

Одна из основных закономерностей, выявленная при изучении генетического контроля биосинтеза легких цепей иммуноглобулинов, оказалась справедливой и для тяжелых цепей: образование тяжелой цепи иммуноглобулинов также контролируется различными генами — переменными и постоянными. Но если для легких цепей обнаружено только два различных типа — каппа и ламбда, то для тяжелых цепей известно 10 различных классов и подклассов, и картина их генетического контроля гораздо сложнее, чем в случае легких цепей. Принадлежность тяжелой цепи к тому или иному классу или подклассу определяется строением ее постоянной области, и в настоящем разделе будут рассмотрены работы, посвященные генам, контролирующим образование постоянной области тяжелых цепей.

Сн-гены изучены у трех видов: человека, кролика и мыши. Закономерности генетического контроля биосинтеза тяжелых цепей оказались одинаковыми у всех изученных видов.

Как уже упоминалось, Грубб (Grubb, 1956) обнаружил внутривидовые различия в антигенном строении иммуноглобулинов человека. Семейный анализ показал, что эти различия наследуются моногбридно, и соответствующий локус был назван Gm. В течение последующих нескольких лет было открыто большое число различных Gm-аллотипов и показано, что эти аллотипические маркеры локализованы на тяжелых цепях молекул IgG (Terrey *et al.*, 1965). Обнаружение большого числа IgG-вариантов совершенно запутало вначале вопрос о характере их наследования, и картина начала проясняться только после того, как были обнаружены подклассы IgG человека. Изучение миеломных белков различных подклассов IgG показало, что некоторые аллотипы локализованы на тяжелых цепях определенного подкласса. Распределение Gm-аллотипов по подклассам гамма-цепей представлено в табл. 5.

Таблица 5

Распределение Gm-маркеров по подклассам гамма-цепей человека (Natvig, Kunkel, 1973)

Подкласс	Gm-аллотип	
	Новая номенклатура	Старая номенклатура
IgG1	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 17, 22	a, x, f, r, e, p, z, y, ne-a
IgG2	23	p
IgG3	5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21	b ¹ , c, a, β, γ, b ² , b ⁴ , s, t, g, ne-g
IgG4		4a, 4b, 4ne-a

Стабильная связь Gm-маркеров с определенными подклассами IgG заставила предположить, что образование тяжелых цепей каждого подкласса IgG определяется отдельными генами (Kunkel *et al.*, 1964). Это предположение следовало также из того, что гамма-цепи разных подклассов, различающихся по первичной структуре, имеются у каждого индивидуума. Таким образом, наличие четырех подклассов гамма-цепей является видовым признаком, и аллельные варианты соответствующих генов определяют наличие на гамма-цепи как генетических маркеров, так и антигенных детерминантов, характерных для гамма-цепей данного подкласса. Локализация антигенных детерминантов, в том числе и генетических маркеров на полипептидной цепи, представлена на рис. 14.

Аллельными вариантами для подкласса IgG1 являются гены Gm(z, a) и Gm(f, ne-a), причем маркеры Gm(z) и Gm(f) локализованы в Fd-фрагменте гамма-цепи, а Gm(a) и Gm(ne-a) — в ее Fc-фрагменте. Аллельные варианты других подклассов маркированы только по Fc-фрагменту молекулы. Аминокислотные замены, характерные для генетических вариантов гамма-цепей IgG человека, представлены в табл. 6.

Анализ аминокислотных замен, приведенных в табл. 6, показывает, что в подавляющем большинстве случаев различия между аллельными вариантами обусловлены различием только одного основания в кодоне. Интересным исключением являются варианты подкласса IgG4. Для

Таблица 6

Аминокислотные остатки, характерные для генетических антигенных маркеров гамма-цепей (Natvig, Kunkel, 1973, с дополнениями из Abel, Despont, 1974)

Маркер	Гамма-цепь	Домен	Положение аминокислотных остатков	Аминокислотные остатки
Gm(a)	$\gamma 1$	Cn3	355—358-е	Арг-Асп-Глю-Лей
не-а	$\gamma 1$ -2-3	Cn3	»	Арг-Глю-Глю-Мет
$\gamma 4$ не-а	$\gamma 4$	Cn3	»	Гли-Глю-Глю-Мет
Gm(f)	$\gamma 1$	Cn1	214-е	Арг
Gm(z)	$\gamma 1$	Cn1	»	Лнз
Gm(4a)	$\gamma 1$ -3-4	Cn2	309-е	Вал-Лей-Гис
Gm(4b)	$\gamma 2$ -4	Cn2	»	Вал-Гис (Лей отсутствует)
Gm(g)	$\gamma 3$	Cn2	296-е	Тир
не-g	$\gamma 2$ -3	Cn2	»	Фен
Gm(b ⁰)	$\gamma 3$	Cn3	436-е	»
не-b ⁰	$\gamma 1$ -2-3	Cn3	»	Тир
$\gamma 1$ -2-3	$\gamma 1$ -2-3	Cn3	445-е	Про
$\gamma 4$ Fc	$\gamma 4$	Cn3	»	Лей

аллельного варианта IgG4a обнаружен лейцин в положении 309, но у IgG4b-варианта в этом положении аминокислотный остаток вообще отсутствует.

Примечательной особенностью генетических маркеров иммуноглобулинов является существование так называемых не-маркеров. К не-маркерам относятся те антигенные детерминанты, которые встречаются по крайней мере у двух различных подклассов IgG, но ведут себя как аллельные варианты только в пределах одного из подклассов. Как можно видеть из рис. 14 и табл. 6, к таким вариантам относятся не-а, не-g, Gm4a и Gm4b (Kunkel e. a., 1970).

Существование аллельных вариантов среди подклассов IgG человека установлено в большом числе работ многими авторами на градиентном материале, и их интерпретация, если рассматривать варианты только одного из подклассов, не представляет затруднений. Однако при попытке оценить аллелизм и сцепление Gm-маркеров всех четырех подклассов в совокупности возникает ряд трудностей. Об одной из них мы уже упоминали — это существование не-маркеров. Вторая трудность заключалась в необычном характере сцепления Cm-генов (Natvig e. a., 1967, 1968).

Оказалось, что гены тяжелых цепей подклассов IgG тесно сцеплены, но некоторые из неаллельных вариантов наследуются только в сцеплении, тогда как другие наследуются, всегда отталкиваясь. Таким образом, Cn-гены существуют в виде определенных стабильных сочетаний, причем состояние сцепления и отталкивания различно в разных расовых группах.

Среди людей европеоидной (белой) расы наиболее распространены генные комплексы Gm^aGm^bGm^{a-} и Gm^{b-c-a}Gm^bGm^a. Каждый из этих комплексов ведет себя как единица наследственности, сцепление генов в пределах комплекса почти абсолютно. Так, маркеры Gm(za) IgG1-подкласса всегда встречаются в сочетании с маркером Gm(g) IgG3-

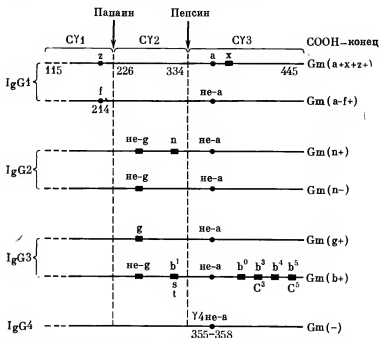
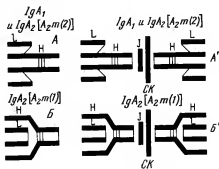


Рис. 14. Распределение генетических маркеров Gm в пределах постоянной области (домены CY1, CY2, CY3) тяжелых полипептидных цепей различных подклассов иммуноглобулинов человека (Natvig, Kunkel, 1973)

Цифры указывают положение аминокислотных остатков, определяющих строение Gm-маркеров; стрелки показывают место действия протеолитических ферментов

Рис. 15. Схема вариантов IgA человека, содержащих (A, A') и не содержащих (B, B') дисульфидные связи между тяжелыми и легкими цепями (Wang, Fudenberg, 1974)

A, B — четырехцепочечные молекулы сывороточных IgA;
A', B' — димерные молекулы секреторных IgA;
СК — секреторная компонента димерных молекул IgA



подкласса, а маркеры Gm(ine-a) IgG1-подкласса — в сочетании с маркером Gm(b) подкласса Ig3. Подобные сочетания Gm-маркеров характерны для представителей европеоидной расы, но у людей негроидной расы иное сочетание Gm-генов, здесь Gm(ia)-ген находится в сочетании с Gm(b)-геном. Аллельные варианты подкласса IgG2 обладают определенной степенью изменчивости, встречаясь в различных комбинациях с аллелями локусов IgG1 и IgG3. Но и в этом случае имеется четко выраженная связь между аллельными вариантами подкласса IgG2 и тем или иным из аллельных вариантов других локусов. Так, частота Gmⁿ⁺- и Gmⁿ⁻-генов у гомозиготных особей GmⁿGm^{na} составляет

0,05 и 0,95 соответственно, как среди белых, так и у монголоидов. Частота же Gm^{a+} и Gm^{b-} -аллелей у $Gm^{a+}Gm^{b-}$ -гомозигот составляет соответственно 0,75 и 0,25. Как у негров, так и у монголоидов с генотипом $Gm^{a+}Gm^{b-}$ аллельный вариант Gm^{a+} полностью отсутствует.

Таким образом, образование постоянных частей тяжелых цепей подклассов IgG контролируется разными тесно сцепленными генами. Домены C_H подклассов IgG имеют большое сходство в первичной структуре, и, вероятно, соответствующие гены произошли в результате дубликации общего предкового гена. Тот факт, что не-а маркер имеется у трех из четырех известных подклассов IgG человека, указывает на то, что дубликации гена, приведшие к возникновению подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, являются недавними эволюционными событиями.

Уникальные структурные различия обнаружены между генетическими вариантами IgA человека. Известно два подкласса IgA: IgA_1 и IgA_2 . Для подкласса IgA_1 генетические маркеры неизвестны. Для IgA_2 -подкласса известны два аллотипических варианта, обозначаемых $A_2m(1)$ и $A_2m(2)$. Семейные и популяционные исследования показали, что образование этих вариантов контролируется аллельными генами одного локуса. Белки, относящиеся к варианту $A_2m(1)$ имеют уникальную для иммуноглобулинов человека структурную особенность, так как у них отсутствуют дисульфидные связи между тяжелыми и легкими цепями (рис. 15) (Mihaesco e. a., 1971).

Вероятно, различия между аллельными вариантами IgA_2 -подкласса не исчерпываются только наличием или отсутствием дисульфидной связи между тяжелыми и легкими цепями. Между вариантами $A_2m(1)$ и $A_2m(2)$ имеются также антигенные различия, а соответствующие аллотипические детерминанты локализованы в C_{H1} -домене альфа-цепи. И, наконец, чрезвычайно важным является то обстоятельство, что ген, контролирующий образование IgA_2 , тесно сцеплен с генами, контролирующими образование тяжелых цепей подклассов IgG (Van Loghem e. a., 1973).

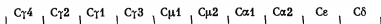
Генетические маркеры не обнаружены до сих пор для IgM, IgD и IgE человека, а для IgM кролика обнаружены аллельные варианты.

Локус, контролирующий образование постоянной области гамма-цепи IgG кролика, обозначается как de-локус. Известны два типа генетических маркеров гамма-цепи кролика: d-группа — аллотипические варианты A11 и A12, различия между которыми обусловлены заменой метионин/треонин в 225-м положении (C_{H1} -домен); e-группа — аллотипические варианты A14 и A15, которые различаются заменой треонин/аланин в 309-м положении гамма-цепи (C_{H2} -домен) (Prahil e. a., 1969; Landucci-Tosi e. a., 1970; Appella e. a., 1971).

Известны генетические варианты для двух подклассов IgA кролика, и соответствующие гены обозначаются как «f» и «g». Генетические антигенные маркеры f- и g-локусов локализованы на постоянной области альфа-цепи; показано, что гены гамма- и альфа-цепей иммуноглобулинов кролика тесно сцеплены (Hanly e. a., 1972, 1973). И, наконец, были обнаружены два аллельных аллотипических маркера, локализованных на постоянной области мю-цепи IgM кролика (Gilman-Sachs, Dray, 1972). Соответствующий локус был обозначен буквой n, а аллельные варианты — n81 и n82. Гибридологический анализ показал, что n-локус сцеплен с локусами гамма- и альфа-цепей иммуноглобулинов кролика.

Установлено также, что гены, контролирующие образование подклассов IgG мыши, сцеплены с геном, контролирующим образование альфа-цепи IgA мыши (Potter, Lieberman, 1967).

Таким образом, у разных видов животных наблюдается одна и та же закономерность: гены, контролирующие образование постоянной области тяжелых цепей разных классов и подклассов, тесно сцеплены. Генетические маркеры для IgD- и IgE-классов неизвестны, но можно думать, что соответствующие гены также сцеплены с остальными C_H -генами. В этом случае участок хромосомы, где локализованы гены тяжелых цепей, должен выглядеть следующим образом:



Данные о генетическом контроле постоянных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов можно суммировать следующим образом: 1) внутривидовые структурные различия между аллельными вариантами тяжелых цепей определяются, как правило, лишь одной аминокислотной заменой; 2) образование постоянной области тяжелых цепей разных классов и подклассов контролируется разными неаллельными генами; 3) гены тяжелых цепей разных классов и подклассов тесно сцеплены; 4) сцепление генов тяжелых цепей имеет не совсем обычный характер, так как они находятся в виде определенных стабильных комплексов, различных для разных рас. Существование определенных стабильных сочетаний неаллельных генов тяжелых цепей иммуноглобулинов указывает на то, что мейотический кроссинговер между соответствующими участками гомологичных хромосом находится «под запретом».

II.5. ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ (V_H -ГЕНЫ)

Выше были приведены доказательства того, что вариабельные области легких цепей иммуноглобулинов контролируются соответствующими генами (V_L -генами), отличными от генов, контролирующих образование постоянных областей легких цепей (C_L -генов). Однако прямые экспериментальные доказательства о сцеплении V - и C -генов легких цепей отсутствуют, и только косвенные данные позволяют предполагать, что V -гены каппа-цепей сцеплены с C -генами каппа-цепей, а V -гены ламбда-цепей сцеплены с C -генами ламбда-цепей. В отличие от этого для вариабельных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов показано, что V_H -гены сцеплены с C_H -генами.

Существует два вида исследований наличия сцепления V_H - и C_H -генов: работы по аллотипам кролика и работы по наследованию идиотипических детерминант. Известны три аллельных варианта иммуноглобулинов кролика, образование которых контролируется аллелями $a1$, $a2$ и $a3$ а-локуса. Первая примечательная особенность этих вариантов состоит в том, что они обнаруживаются во всех классах иммуноглобулинов кролика — IgG, IgA, IgM и IgE, но в то же время аллотипы $a1$, $a2$ и $a3$ локализованы не на легких цепях, а на тяжелых (Wilkinson, 1969; Mole e. a., 1971, 1975).

Изучение аллотипических маркеров на индивидуальных молекулах иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки кроликов — двойных гетерозигот генотипа *ale14* (хромосома от одного родителя) *a2e15* (хромосома от второго родителя), показало, что на одной полипептидной цепи, как правило, обнаруживаются только те аллотипические детерминанты, соответствующие гены которых расположены в *цис*-положении, т. е. на одной хромосоме (Landucci-Tosi e. a., 1970). Отсюда следует вывод, что объединение V- и С-генов в единый VC-ген осуществляется только в отношении тех генов, которые расположены на одной хромосоме.

Изучение аллотипических маркеров а-локуса, а также локусов $\chi 32$ и $\chi 33$ привело к чрезвычайно важному выводу о том, что V_H -гены являются общими для разных классов иммуноглобулинов. Этот вывод следует из того, что соответствующие аллотипические маркеры обнаруживаются на молекулах IgG, IgA и IgM, а это, в свою очередь, означает, что один и тот же V_H -ген может находиться в сочетании с любым C_H -геном (т. е. в составе единого VC-гена). Этот вывод подтвердился при изучении первичной структуры миеломных иммуноглобулинов человека и мыши. Известно что вариабельные области тяжелых цепей состоят как минимум из четырех вариабельных подгрупп¹ (Carra, Kehoe, 1974; Florent e. a., 1974). Как уже отмечалось, аминокислотные различия в пределах подгруппы не превышают 25%, тогда как вариабельные области тяжелых цепей различных подгрупп могут различаться по 75% аминокислотных остатков. В ряде работ показано, что V_H -подгруппы тяжелых цепей являются общими для всех классов иммуноглобулинов, т. е. вариабельная область тяжелой цепи, относящаяся к одной и той же подгруппе, например V_{H1} , может встречаться в составе одной полипептидной цепи с постоянной областью тяжелых цепей различных классов и подклассов (Wang e. a., 1970a, b, 1971). Аминоконцевые пептиды, характерные для той или иной вариабельной подгруппы, обнаружены у нормальных иммуноглобулинов человека, причем различия между отдельными индивидами по этому признаку отсутствуют. Следовательно, V_H -подгруппы контролируются неаллельными генами.

Прямые экспериментальные доказательства существования гаметически наследующихся V_H -генов специфических антител и сцепления этих генов с C_H -генами получены в работах по изучению идиотипических антигенических детерминант антител. К идиотипическим детерминантам относятся те индивидуальные антигенные детерминанты, которые присущи только антителам определенной специфичности и отсутствуют у антител иной специфичности (Гурвич, Оловников, 1960; Зильбер и др., 1960; Oudin, Michel, 1969). Специфичность идиотипов обусловлена строением вариабельных областей полипептидных цепей антител, и в основном строением тяжелой цепи.

Установлено, что антитела одной и той же специфичности, выделенные из иммунных сывороток мышей различных инбредных линий, могут различаться по строению идиотипических детерминант и эти различия являются маркерами V_H -генов, определяющих специфичность данных антител.

Обнаружено пять V_H -генов, определяющих специфичность антител к фосфорилхолину (Sher, Cohn, 1972; Lieberman e. a., 1974), к α -1,3-декстрану, азобензоату, фениларсонату и стрептококке группы А. Во всех

случаях V_H -гены оказались сцепленными с C_H -генами (Kuettner e. a., 1972; Carson, Weigert, 1973); Eichman, 1973; Pawlak e. a., 1973; Eichman e. a., 1974).

Однако не исключена возможность того, что образование антител одной и той же специфичности контролируется разными V_H -генами. Так, установлена первичная структура варибельной области альфа-цепей трех миеломных IgA мыши с антифосфорилхолиновой активностью и показано, что между ними имеется от четырех до девяти замен. Кроме того, эти белки различаются по длине третьего гиперварибельного участка (Rudikoff, Potter, 1976). В результате исследования первичной структуры трех препаратов антител кролика к полисахариду пневмококка установлены различия в строении варибельных областей тяжелых цепей, причем антитела к пневмококку различались не только по длине третьего гиперварибельного участка, но и по его аминокислотной последовательности в такой степени, что трудно установить какую бы то ни было простую однозначную связь между первичной структурой гиперварибельных участков и специфичностью (Jaton, 1976).

Отсутствует также однозначная связь между принадлежностью тяжелых цепей антител к той или иной V_H -подгруппе, определяемой исходя из первичной структуры, и локализацией V_H -генов мыши на генетической карте, построенной на основании опытов по наследованию идиотипических детерминант. Так, при исследовании первичной структуры тяжелых цепей антител разных идиотипов выявлено, что, с одной стороны, антитела одной и той же варибельной подгруппы V_HIII локализованы в двух разных генетически картированных сублокусах V_H -генов мыши, а с другой — что в одном и том же сублокусе обнаружены антитела, принадлежащие к двум разным варибельным подгруппам — V_HII и V_HIII (Сарга e. a., 1976). Очевидно, для устранения выявленных противоречий необходимо гораздо больше информации как о первичной структуре варибельных областей антител, так и о характере их наследования.

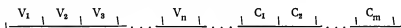
Изложенные в настоящем разделе работы можно суммировать следующим образом: 1) образование варибельных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов контролируется V_H -генами, отличными от C_H -генов, контролирующих образование постоянных областей тяжелых цепей; 2) различные V_H -гены контролируют образование антител различной специфичности; 3) число гаметически наследующихся генов неизвестно, но их должно быть не меньше, чем известно варибельных подгрупп тяжелых цепей и идиотипических вариантов, наследственная природа которых доказана; 4) V_H -гены сцеплены с C_H -генами.

II.6. ВОЗМОЖНЫЕ СХЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, КОНТРОЛИРУЮЩЕГО БИОСИНТЕЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Семейство иммуноглобулиновых генов можно разбить на три группы, каждая из которых контролирует образование полипептидных цепей определенного типа: тяжелых цепей, легких kappa-цепей и легких lambda-цепей. Для понимания механизмов биосинтеза иммуноглобули-

нов чрезвычайно важным является вопрос, на одной и той же или на разных хромосомах локализованы гены, контролирующие образование тяжелых и легких цепей. Установлено, что гены тяжелых и легких цепей расположены на разных неомологичных аутосомах, и это справедливо для всех изученных в этом отношении видов животных (Gally, Edelman, 1972; Beckers *et al.*, 1974).

Участок хромосомы, в котором локализованы структурные гены, определяющие строение того или иного типа полипептидной цепи, был назван транслоконом (Gally, Edelman, 1972). В состав данного транслокона входят как гены, контролирующие строение вариабельной области полипептидных цепей определенного типа, так и гены, контролирующие образование постоянной области полипептидной цепи, причем V-гены сгруппированы отдельно от С-генов. В общем виде модель транслокона выглядит следующим образом:



Участок хромосомы, где расположены структурные гены иммуноглобулинов, назван транслоконом по той причине, что предполагаемый механизм объединения V- и С-генов в единый VC-ген происходит по типу транслокации, в результате чего тот или иной V-ген переносится (транслоцируется) в пределах транслокона с одного места на другое.

В геноме млекопитающих существует по крайней мере три различных транслокона, каждый из которых локализован на разных неомологичных аутосомах. В одном транслоконе содержатся V- и С-гены, определяющие строение легких цепей каппа-типа; во втором — V- и С-гены легких цепей ламбда-типа и, наконец, третий транслокон состоит из V- и С-генов, контролирующих образование тяжелых цепей всех классов и подклассов. Транслоконы иммуноглобулинов человека схематически изображены на рис. 16. Объединение V- и С-генов в единый транскрибируемый VC-ген происходит только в пределах данного транслокона, в результате чего из всего набора генов в пределах транслокона становятся активными только два гена — один V и один С. Дифференцировка лимфоидных клеток по иммуноглобулиновым генам осуществляется не только в отношении тесно сцепленных генов в пределах данного транслокона, но и в отношении генов каппа- и ламбда-цепей, расположенных на разных хромосомах. Кроме того, для иммуноглобулиновых генов известен феномен так называемого аллельного исключения, который состоит в том, что в индивидуальной лимфоидной клетке активен только один из двух аллельных генов (Mage, 1974).

Таким образом, основное положение клонально-селекционной теории Бернета (Burnet, 1959) «одна клетка — одно антитело» реализуется за счет того, что в индивидуальной лимфоидной клетке из всего набора иммуноглобулиновых генов активны только четыре гена, а именно V_L , C_L и V_H , C_H (рис. 17).

О механизмах активации или репрессии аллельных генов иммуноглобулинов и генов κ и λ , расположенных на разных аутосомах, отсутствуют какие бы то ни было данные, и здесь мы остановимся на возможных механизмах избирательного «включения» генов, входящих в состав одного транслокона.

Прежде всего возникает вопрос, на каком уровне происходит объединение V- и С-генов в пределах транслокона. В принципе возможны

Рис. 16. Гены, контролирующие образование полипептидных цепей иммуноглобулинов

Три группы генов (κ , λ , H) — транслоконы расположены на трех негомологичных аутозомах. Гены одного транслокона контролируют образование одной из групп цепей: легких цепей каппа- или ламбда-типа и тяжелых цепей разных классов и подклассов. В состав каждого транслокона входят V - и C -гены. В единый VC -ген могут объединяться только гены, входящие в состав одного транслокона. I, II, \dots, V_H — разные гены V -области; $\gamma (1-4)$, $\mu (1, 2)$, $\alpha (1, 2)$, δ, ϵ — гены, контролирующие C -области тяжелых цепей

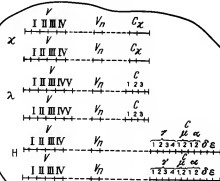
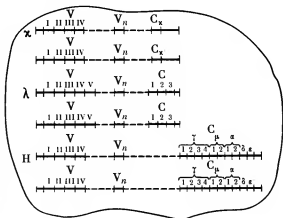
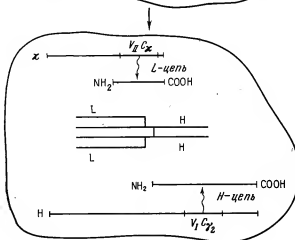


Рис. 17. Схема дифференцировки лимфоидной клетки (А) в антителопродуцирующую плазматическую клетку (Б)

Из всего набора иммуноглобулиновых генов в данной плазматической клетке активны только гены V_L , C_L , V_H , C_H . Остальные обозначения те же, что на рис. 16



три варианта: объединение продуктов активности V- и С-генов на уровне полипептидной цепи; объединение на уровне мРНК, транскрибируемой отдельно с V- и С-генов; объединение V- и С-генов в единый VC-ген на уровне ДНК.

Существуют веские данные о том, что справедливым является последнее предположение и объединение V- и С-генов происходит на уровне ДНК. Так, было показано, что включение радиоактивных аминокислот в процессе трансляции как легкой, так и тяжелой полипептидной цепи происходит равномерно по мере увеличения длины синтезирующейся полипептидной цепи и размеры полирибосом соответствуют длине мРНК, достаточной для того, чтобы с одной молекулы мРНК считывалась полипептидная цепь длиной в 450 аминокислот в случае тяжелой цепи и 210 аминокислот в случае легкой цепи (Williamson, 1971). Выделенная из клеток миеломы мыши мРНК способна стимулировать биосинтез полной полипептидной цепи как в условиях бесклеточной системы, так и в ооцитах лягушки (Gurdon e. a., 1971; Stanvezeg, Huang, 1971).

Матричная РНК легких цепей иммуноглобулинов, как и мРНК других белков, имеет последовательность полиА на 3'-конце молекулы. Ее молекулярный вес составляет 400 000, что соответствует 1200 нуклеотидам. Около 700 оснований необходимо для кодирования самого белка, 200 оснований приходится на полиА-участок, а функция около 300 оснований неизвестна (Milstein e. a., 1972). Если объединение V- и С-генов происходит на уровне ДНК, то последовательность оснований в мРНК должна быть непрерывной и соответствовать последовательности белка в пограничной VC-области. Действительно, при исследовании первичной структуры мРНК легких цепей мыши установлено, что в мРНК имеется последовательность оснований, соответствующая 105—108 остаткам аминокислот легкой цепи, т. е. участку, пограничному между V- и С-половинами цепи (Milstein e. a., 1974).

Еще одним доказательством объединения V- и С-генов на уровне ДНК являются работы, в которых изучалась структура белков при так называемой болезни тяжелых цепей человека. При этом заболевании тяжелая цепь укорочена за счет делеции участка полипептидной цепи, куда во многих случаях входит последовательность, охватывающая пограничный участок между вариабельной и постоянной областями цепи. Аналогичную делецию удалось получить экспериментально при анализе мутантов миеломных клеток мыши (Milstein e. a., 1974), причем в последнем случае точно известно, что делеция возникла после объединения V- и С-генов, так как клетки исходной линии синтезировали тяжелые цепи нормальной длины.

Каким же образом происходит в пределах транслокона объединение раздельных V- и С-генов в единый VC-ген? По этому вопросу отсутствуют какие-либо экспериментальные данные, имеются только более или менее правдоподобные умозрительные предложения. Согласно одному из них предполагается, что на одном конце транслокона сгруппированы тандемно расположенные V-гены, а на другом конце транслокона сгруппированы С-гены (Gally, Edelman, 1972). Предполагается также, что любой V-ген в пределах транслокона может объединиться с любым С-геном этого же транслокона. Гипотетические механизмы объединения V- и С-генов состоят в том, что V-ген как бы «вырезается» из соответствующего участка ДНК и интегрируется в новый участок, находя-

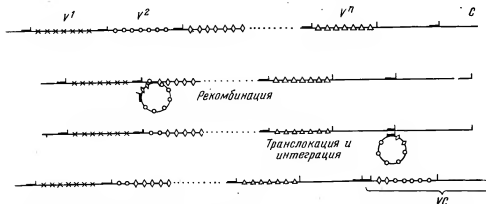


Рис. 18. Гипотетический механизм объединения V- и C-генов в единый VC-ген (Gally, Edelman, 1972)

V¹, V², ..., Vⁿ — разные гены вариабельной области; C — ген постоянной области полипептидных цепей иммуноглобулинов

щийся в непосредственной близости с одним из C-генов. Такая интеграция может произойти или в результате внутритранслоконного кроссинговера или же с помощью процесса, напоминающего интеграцию эписомы в бактериальную ДНК (рис. 18).

Косвенным подтверждением подобного механизма объединения V- и C-генов являются некоторые особенности первичной структуры тяжелых и легких цепей (Сарга, Кеное, 1974; Florent e. a., 1974). Оказалось, что последовательность трех последних остатков вариабельной области и двух первых остатков постоянной области тяжелых цепей (т. е. последовательность пограничного участка между V и C) весьма сходна у тяжелых цепей разных классов и подклассов, так же как и у различных вариабельных подгрупп тяжелых цепей. Эта последовательность охватывает остатки 113—117 у гамма-цепей и остатки 122—126 у мю-цепей. Альфа-цепи имеют аналогичную последовательность. Легкие цепи иммуноглобулинов также имеют в «пограничном» участке сходную последовательность вне зависимости от типа легкой цепи и вариабельной подгруппы.

Подобная идентичная последовательность нуклеотидов у разных V- и C-генов может служить в качестве той сигнальной последовательности, которая распознается соответствующими ферментами (или ферментом), участвующими в «изъятии» V-генов из одного участка ДНК и интеграции в пределах данного транслокона в другой участок ДНК, где локализованы C-гены.

Сигнальными последовательностями для ферментов типа рестриционных эндонуклеаз (рестриктаз) являются короткие двуспиральные последовательности ДНК, обладающие поворотной симметрией («палиндромы»). Анализ аминокислотной последовательности пограничных VC-участков тяжелых и легких цепей и экстраполяция этой последовательности на уровень последовательности ДНК с учетом вырожденности генетического кода и неопределенности третьего основания в кодоне показали, что для иммуноглобулиновых генов действительно су-

Таблица 7

Последовательности ДНК иммуноглобулиновых генов, обладающие поворотной симметрией в пограничной VC-области (Fougereau e. a., 1976, с сокращениями)

Шифр белка	Класс, под-класс H-цепи	Вариантная под-группа	Последовательность аминокислот	Предполагаемая последовательность нуклеотидных оснований в ДНК		
Eu	$\gamma 1$	V _H I	Лей-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Ала (115)	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
Nie	$\gamma 1$	V _H III	Лей-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Ала	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
Ou	μ	V _H II	Тре-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Гли	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
Gal	μ	V _H III	Лей-Вал-Тре-Вал-Сер-Тре-Гли	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
МОРС 173	$\gamma 2a$	V _H III	Сер-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Ала	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
МОРС 21	$\gamma 1$	V _H III	Сер-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Ала	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>
МОРС 603	α	V _H III	Тре-Вал-Тре-Вал-Сер-Сер-Глу	<div>ХГТХАЦХ ХЦАХТГХ</div>	ГТ ЦА	<div>ХТЦХАГ ХАГХТЦ</div>

Примечание. (115) — место валина во всех белках.

существуют последовательности типа палиндромов (Fougereau e. a., 1976). Эти последовательности для тяжелых цепей иммуноглобулинов человека и мыши приведены в табл. 7.

Объединение V- и С-генов в единый VC-ген, осуществляемое с помощью рестриктаз, может идти не только по пути объединения генов с сохранением генетического материала в пределах транслокона (рис. 18), но может произойти благодаря делеции всего генетического материала, который разделяет объединяемые V- и С-гены. И, наконец, вполне возможно, что происходит амплификация одного из V-генов транслокона и затем уже экстракопии этого гена встраиваются и объединяются с тем или иным С-геном. В последнем случае экстракопии одного и того же гена могут объединиться с разными С-генами в пределах транслокона.

Уже само по себе объединение одного из V-генов с одним из С-генов в единый VC-ген может служить тем механизмом дифференцировки в пределах данного транслокона, который приводит к транскрипции объединенного VC-гена и к подавлению активности остальных разобщенных V- и С-генов. Однако остается открытым вопрос, является ли стабильным данный VC-ген среди потомков данной лимфоидной клетки или же в процессе развития клона иммунокомпетентных клеток происходит переключение активности с одного гена (генов) на другой.

Существуют определенные экспериментальные доказательства того,

что один и тот же V-ген может объединяться с разными С-генами. Это следует из анализа первичной структуры так называемых биклональных миелом. В некоторых случаях у одного и того же больного выявляются два миеломных иммуноглобулина, относящихся к разным классам и синтезирующихся разными популяциями миеломных клеток. Обнаружены следующие пары миеломных иммуноглобулинов: IgM-IgG, IgM-IgA и IgG-IgA. Изучение первичной структуры этих белков показало, что каждый из них обладает строением постоянной области тяжелой цепи, характерным для данного класса, т. е. парные миеломные иммуноглобулины различаются по строению постоянной области тяжелой цепи (Wang e. a., 1970, 1974; Levin e. a., 1971; Fair e. a., 1974; Wolfenstein-Todel e. a., 1974; Sledge e. a., 1976).

Однако оказалось, что вариабельные области тяжелых цепей биклональных миелом идентичны по строению, т. е. одна и та же вариабельная область тяжелой цепи находится в сочетании с постоянной областью разных классов. К этому следует добавить, что миеломные иммуноглобулины разных классов имеют также идентичные легкие цепи, и совокупность этих фактов, несомненно, указывает на то, что пары биклональных миелом (IgM-IgG, IgM-IgA, IgG-IgA) имеют общее происхождение и переключение синтеза с одного класса иммуноглобулинов на другой произошло в пределах одного клона клеток в процессе его малигнизации.

Идентичность строения вариабельных областей биклональных миелом разных классов, вероятно, объясняется тем, что в пределах транслокона тяжелых цепей может происходить переключение активности с одного гена на другой. Возможны два варианта такого переключения. 1. Переключение происходит за счет того, что V_H -ген, который был в составе объединенного VC-гена с С-геном, например, μ -цепи, объединяется затем с С-геном гамма-цепи (или альфа- и т. д.). Но для этого V-гену необходимо вначале выйти из состава прежнего VC-гена, что делает подобный механизм переключения активности генов в пределах транслокона в достаточной мере громоздким. 2. Вначале происходит амплификация одного из V-генов в количестве 2—4 копий, и затем экстракопии этого V-гена объединяются с разными С-генами. Каков реальный механизм избирательного включения и выключения генов в пределах транслокона предстоит выяснить в будущем.

Литература

- Гураич А. Е., Оловников А. М. Сравнение антигенных свойств чистых антител и неспецифических γ -глобулинов.— Биохимия, 1960, 25, с. 646—653.
- Зильбер Л. А., Гардашьян А. М., Аверина З. А. Об особенностях антигенной структуры иммунных глобулинов.— Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол., иммунол., 1960, 4, с. 26—31.
- Рохлин О. В., Незлин Р. С., Венгерова Т. И. Генетические варианты легких цепей иммуноглобулинов крысы. Обнаружение и количественная характеристика.— Мол. биол., 1970, 4, с. 906—918.
- Abel C. A., Despont J.-P. An amino acid deletion associated with the IgG4b allotype of human IgG4 myeloma proteins.— J. Immunogenetics, 1974, 1, p. 79—85.
- Appella E., Chersi A., Mage R. G., Dubiski S. Structural basis of the A14 and A15 allotypic specificities in rabbit immunoglobulin.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, 68, p. 1341—1345.
- Beckers A., Querinjean P., Bazin H. Allotypes of rat immunoglobulins. II. Distribution of the allotypes of kappa and alpha chain loci in different inbred strains of rats.— Immunochemistry, 1974, 11, p. 605—610.
- Braun D. G., Jaton J.-C. The aminoterminal sequence of antibody light chains: evidence for possible inheritance of

- structural genes. — *Immunochemistry*, 1973, 10, p. 387—396.
- Burnet F. M. The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt Univ. Press, 1959.
- Burstein Y., Kantor F., Schechter I. Partial amino acid sequence of the precursor of an immunoglobulin light chain containing NH₂-terminal pyroglutamic acid. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 2604—2608.
- Capra J. D., Berek C., Eichman K. Structural studies on induced antibodies with defined idiotype specificities. III. N-terminal amino acid sequence of the heavy and light chains of mouse anti-streptococcal antibodies—ASA, S8 and S 117. — *J. Immunol.*, 1976, 117, p. 7—10.
- Capra J. D., Kehoe J. M. Variable region sequences of five human immunoglobulin heavy chains of the V_HIII subgroup: definitive identification of four heavy chain hypervariable regions. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, 71, p. 845—848.
- Carson D., Weigert M. Immunochemical analysis of the cross-reacting idiotypes of mouse myeloma proteins with anti-dextran activity and normal anti-dextran antibody. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, 70, p. 235—238.
- Edelman G. M., Gottlieb P. D. A genetic marker in the variable region of light chains of mouse immunoglobulins. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1970, 67, p. 1192—1199.
- Eichman K. Idiotypic expression and the inheritance of mouse antibody clones. — *J. Exptl. Med.*, 1973, 137, p. 603—621.
- Eichman K., Tung A. S., Nisonoff A. Linkage and rearrangement of genes encoding mouse immunoglobulin heavy chains. — *Nature*, 1974, 250, p. 509—511.
- Fair D. S., Krueger K. G., Gleich G. J., Kyle R. A. Studies on IgA and IgG monoclonal proteins derived from a single patient. I. Evidence for shared individually specific antigenic determinants. — *J. Immunol.*, 1974, 112, p. 201—209.
- Farnsworth V., Goodflesh R., Rodkey S., Hood L. Immunoglobulin allotypes of rabbit kappa chains: polymorphism of a control mechanism regulating closely linked duplicated genes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 1293—1296.
- Fett J. W., Deutsch H. G. A new λ -chain gene. — *Immunochemistry*, 1975, 12, p. 643—652.
- Florent G., Lenham D., Putnam F. W. The swith point in heavy chains of human IgM immunoglobulins. — *Biochemistry*, 1974, 13, p. 2482—2490.
- Fougereau M., Bourgeois A., Preval C. e. a. The complete sequence of the murine monoclonal immunoglobulin MOPC 173 (IgG2a): genetic implications. — *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127C, p. 607—631.
- Gally J. A., Edelman G. M. The genetic control of immunoglobulin synthesis. — *Annual Rev. Genet.*, 1972, 6, p. 1—46.
- Gibson D. Genetic polymorphism of mouse immunoglobulin light chains revealed by Isoelectric focusing. — *J. Exptl. Med.*, 1976, 144, p. 298—305.
- Gibson D., Levanson M., Smithies O. Heterogeneity of normal human Ig light chains. Non-allelic variation in the constant region of λ -chains. — *Biochemistry*, 1971, 10, p. 3114—3122.
- Gilman-Sachs A., Dray S. Identification and genetic control of two rabbit IgM allotypic specificities. — *Europ. J. Immunol.*, 1972, 2, p. 505—512.
- Gilman-Sachs A., Mage R., Young G. O. e. a. Identification and genetic control of two rabbit immunoglobulin allotypes at a second light chain locus, the c locus. — *J. Immunol.*, 1969, 103, p. 1159—1167.
- Gottlieb P. D. Genetic correlation of a mouse light chain variable region marker with a thymocyte surface antigen. — *J. Exptl. Med.*, 1974, 140, p. 1432—1437.
- Grubb R. Agglutination of erythrocytes coated with incomplete anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups. — *Acta pathol. microbiol. scand.*, 1956, 39, p. 195—203.
- Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R., Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study on mRNA and its translation in living cells. — *Nature New Biol.*, 1971, 232, p. 177—178.
- Gutman G. A., Loh E., Hood H. Structure and regulation of immunoglobulins: Kappa allotypes in the rat have multiple amino-acid differences in the constant region. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, 72, p. 5046—5050.
- Hanly W. C., Knight K. L., Gilman-Sachs A. e. a. Close linkage of the genes for rabbit IgA allotypes Af71 to Af75 to the chromosomal region controlling immunoglobulin heavy chain allotypes. — *J. Immunol.*, 1972, 108, p. 1723—1725.
- Hanly W. C., Lichter E. A., Dray S., Knight K. L. Rabbit immunoglobulin A allotypic specificities. Localization to two papain fragments, Fab_{2a} and Fc_{2a} of secretory immunoglobulin A. — *Biochemistry*, 1973, 12, p. 733—741.
- Herzenberg I. A. A chromosome region for gamma 2a and beta-2A-globulin H-chain isoantigens in the mouse. — *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1964, 29, p. 455—463.
- Hess M., Hilschmann N., Rivat L., Ropartz C. Isotypes of human immunoglobulins.

- bulin λ -chains.—*Nature New Biol.*, 1971, 234, p. 58—60.
- Hiltschmann N., Craig L. C. Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, 53, p. 1400—1409.
- Hood L. The genetics, evolution and expression of antibody molecules.—*Stadler Sympos.*, 5, 1973, p. 73—142.
- Hood L., Eichmann K., Lackland H. e. a. Rabbit antibody light chains and gene evolution.—*Nature*, 1970, 228, p. 1040—1044.
- Jaton J.-C. The V-region sequence of the H-chain from a third rabbit anti-pneumococcal antibody.—*Biochem. J.*, 1976, 157, p. 449—459.
- Kim B. S., Dray S. Identification and genetic control of allotypic specificities on two variable region subgroups of rabbit immunoglobulin heavy chains.—*Europ. J. Immunol.*, 1972, 2, p. 509—515.
- Kuettner M. G., Wang A.-C., Nisonoff A. Quantitative investigations at idiotypic antibodies. VI. Idiotypic specificity as a potential genetic marker for the variable regions of mouse immunoglobulin polypeptide chains.—*J. Exptl Med.*, 1972, 135, p. 579—595.
- Kunkel H. G., Allen J. C., Grey H. M. e. a. A relationship between the H-chain groups of 7S γ -globulin and the Gm system.—*Nature*, 1964, 203, p. 413—415.
- Kunkel H. G., Joslin F. G., Penn G. M., Natvig J. B. Genetic variants of γ G4 globulin. A unique relationship of other classes of γ G-globulin.—*J. Exptl Med.*, 1970, 132, p. 508—520.
- Landucci-Tosi S., Mage R. G., Dubiski S. Distribution of allotypic specificities A1, A2, A14 and A15 among immunoglobulin G molecules.—*J. Immunol.*, 1970, 104, p. 641—647.
- Levin A. S., Fudenberg H. H., Hopper J. E. e. a. Immunofluorescent evidence for cellular control of synthesis of variable regions of light and heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1971, 68, p. 169—171.
- Lieberman R., Potter M., Mushinski E. B. e. a. Genetics of a new IgV_H (T15 idio-type) marker in the mouse regulating natural antibody to phosphorylcholine.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 983—1001.
- Mage R. Structural localization allelic exclusion and linkage relationship of rabbit allotypes.—In: *Progress in Immunology*. N. Y.—London, Acad. Press, 1971, p. 47.
- Mage R. G. Altered quantitative expression of immunoglobulin allotypes in rabbits.—*Current Topics Microb. Immunol.*, 1974, 63, p. 131—152.
- Mihaesco E., Seligmann M., Frangione B. Heavy-light chain disulphide bridge common to γ A1 and a genetic variant of γ A2 immunoglobulins.—*Nature New Biol.*, 1971, 232, p. 220—222.
- Milstein C. The basic sequences of immunoglobulin kappa chains: sequence studies of Bence-Jones proteins.—*FEBS Letters*, 1969, 2, p. 301—305.
- Milstein C., Brownlee G. G., Harrison T. M., Mathews M. B. A possible precursor of immunoglobulin light chains.—*Nature*, 1972, 239, p. 117—120.
- Milstein C., Secher D. S., Cowan N. J. e. a. Immunoglobulin mRNA, immunoglobulin mutants, and the integration of two genes into one polypeptide.—In: *Cellular selection and regulation in the immune response*. N. Y., Acad. Press, 1974, p. 245—264.
- Milstein C. P., Steinberg A. G., McLaughlin C. L., Solomon A. Amino acid sequence change associated with genetic marker InV(2) of human immunoglobulin.—*Nature*, 1974, 248, p. 160—161.
- Mole L. E., Geiler M. D., Koshland M. E. The isolation and characterization of different a locus allotype.—*J. Immunol.*, 1975, 114, p. 1442—1453.
- Mole L. E., Jackson S. A., Porter R. R., Wilkinson J. M. Allotypically related sequences in the Fd fragment of rabbit immunoglobulin heavy chains.—*Biochem. J.*, 1971, 124, p. 301—318.
- Muir W. A., Steinberg A. G. On the genetics of the human allotypes, Gm and InV.—*Seminars Hematol.*, 1967, 4, p. 166—178.
- Natvig J. B., Kunkel H. G. Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants and idiotypes.—*Adv. Immunol.*, 1973, 16, p. 1—59.
- Natvig J. B., Kunkel H. G., Gedde-Dahl T. Genetic studies of the heavy chain subgroups of γ G-globulin. Recombination between the closely linked cistrons.—*Nobel Symposium*, v. 3. Stockholm, 1967, p. 313—325.
- Natvig J. B., Kunkel H. G., Yount W. J., Nielsen J. C. Further studies on the γ G-heavy chain gene complexes with particular reference to the genetic markers Gm(g) and Gm(n).—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 763—784.
- Oudin J. Serologie-l'allotypie de certaine antigenes proidiques du serum.—*Compt. Rend.*, 1956, 242, p. 2606—2611.
- Oudin J., Michel M. Idiotypy of rabbit antibodies.—*J. Exptl Med.*, 1969, 130, p. 595—642.
- Pawlak L. L., Mushinski E. B., Nisonoff A., Potter M. Evidence for the linkage of the IgC_H locus to a gene controlling the idiotypic specificity of anti-p-azophenyl-arsenate antibodies in strain A mice.—

- J. Exptl Med., 1973, 137, p. 22—31.
- Poljak R. J., Amzel L. M., Phizackerley R. P. Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins.—*Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1976, 31, p. 67—93.
- Potter M., Lieberman R. Genetic of immunoglobulins in the mouse.—*Adv. Immunol.*, 1967, 7, p. 92—146.
- Prahl J. W., Mandy W. J., Todd C. W. The molecular determinations of the A11 and A12 allotypic specificities in rabbit immunoglobulin.—*Biochemistry*, 1969, 8, p. 4935—4943.
- Ropartz C., Lenoir J., Rivat L. A new inheritable property of human sera: the InV factor.—*Nature*, 1961, 189, p. 586—587.
- Rudikoff S., Potter M. Size differences among immunoglobulin heavy chains from phosphorylcholine-binding proteins.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 2109—2113.
- Schechter I., Burstein Y., Spiegelman S. Structure and function of immunoglobulin genes and immunoglobulin precursors.—*Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127C, p. 421—435.
- Sher A., Cohn M. Inheritance of an idiotype associated with immune response of inbred mice to phosphorylcholine.—*Europe. J. Immunol.*, 1972, 2, p. 319—326.
- Sledge C., Fair D. S., Black B. e. a. Antibody differentiation: apparent sequence identity between variable regions shared by IgA and IgG immunoglobulins.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 923—927.
- Sogn J. A., Yarmush M. L., Kindt T. J. An idiotype marker for the V_L region of an homogeneous antibody.—*Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127C, p. 397—408.
- Stavnezer J., Huang R.-C. Synthesis of mouse Ig light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system.—*Nature New Biol.*, 1971, 230, p. 172—174.
- Swan D., Aviv H., Leder P. Purification and properties of biologically active messenger RNA for a myeloma light chain.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1972, 69, p. 1967—1971.
- Terry W. D., Fahey J. L., Steinberg A. G. Gm and InV factors in subclasses of human IgG.—*J. Exptl Med.*, 1965, 122, p. 1087—1102.
- Van Loghem E., Wang A.-C., Shuster J. A new genetic marker of human immunoglobulins determined by an allele at the $\alpha 2$ locus.—*Vox Sang.*, 1973, 24, p. 481—495.
- Vengerova T. U., Rokhlin O. V., Nezhin P. C. [Венгерова Т. И., Рохлин О. В., Незлин П. С.]. Chemical differences between two allotypic variants of light chains of rat immunoglobulins. Peptide mapping and cyanogen bromide cleavage.—*Immunochemistry*, 1972, 9, p. 1239—1246.
- Wang A.-C., Fudenberg H. H. IgA and evolution of immunoglobulins.—*J. Immunogenet.*, 1974, 4, p. 3—28.
- Wang A.-C., Fudenberg H. H., Pink J. R. L. Heavy chain variable regions in normal and pathological immunoglobulins.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1971, 68, p. 1143—1146.
- Wang A.-C., Pink J. R. L., Fudenberg H. H., Ohms J. A variable region subclass of heavy chains common to immunoglobulins G, A and M and characterized by unblocked aminoterminal residue.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1970a, 66, p. 657—663.
- Wang A.-C., Wilson S. K., Hopper J. E. e. a. Evidence for control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1970b, 66, p. 337—343.
- Wilkinson J. M. Variation in the N-terminal sequence of heavy chains of immunoglobulin G from rabbits of different allotype.—*Biochem. J.*, 1969, 112, p. 173—185.
- Williamson A. R. Biosynthesis of antibodies.—*Nature*, 1971, 231, p. 359—362.
- Wolfenstein-Todel C., Franklin E. C., Ruders R. A. Similarities of the light chains and the variable regions of the heavy chains of the IgG₂ and IgA₁ myeloma proteins from a single patient.—*J. Immunol.*, 1974, 112, p. 871—876.

III

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОСИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Изучение молекулярных механизмов синтеза иммуноглобулинов представляет принципиальный интерес с самых разных точек зрения. Синтез иммуноглобулинов — хорошая модель для изучения процессов развития; переключение биосинтеза с IgM на IgA и IgG — интереснейший пример изменения экспрессии генов в процессе дифференцировки одной клетки. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов, пока совершенно не изучены. Не исследованы и процессы, приводящие к образованию полипептидных цепей, разные участки которых кодируются разными генами. Многоцепочная структура иммуноглобулинов делает их удобной моделью и для изучения биосинтеза сложных белковых молекул и выяснения механизмов сборки и секреции таких молекул из клетки.

III.1. МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Весьма удобную модель представляют собой антитела. Это специфические белки, образование которых протекает в строго детерминированные сроки. Поэтому ткани иммунизированных животных широко используются для изучения процессов, связанных с образованием иммуноглобулинов. Было показано, что иммунизация животных приводит к интенсификации синтеза ДНК (Moav e. a., 1973), РНК (Mach, Vassalli, 1965) и белка (Учитель, Хасман, 1967) (рис. 19). Часть этих явлений, по-видимому, прямо связана с синтезом антител или иммуноглобулинов. Указанием на это служат данные об изменении под действием антигена картины репликации ДНК (Souleil, Panijel, 1970), увеличении количества транскрибируемых последовательностей ДНК (Moav e. a., 1976) и появлении новых видов РНК (Cohen, 1967b), хотя последнее рядом исследователей ставится под сомнение.

Образование антител представляет собой уникальный процесс, важнейшим компонентом которого является клеточная пролиферация (а не просто интенсификация синтеза белка в уже имеющихся клетках). Поэтому приходится считаться с тем, что большая часть биохимических изменений в лимфоидной ткани при иммунизации относится не к образованию иммуноглобулинов, а к процессам, обусловленным клеточной дифференцировкой и пролиферацией, маскирующими изменения, связанные непосредственно с синтезом иммуноглобулинов.

Сильно осложняет задачу изучения механизмов биосинтеза иммуноглобулинов и гетерогенность нормальных лимфоидных тканей. Выделение из них продуцентов иммуноглобулинов до сих пор не разработано, так как существующие методы разделения клеточных популяций

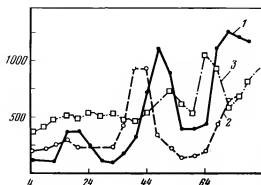


Рис. 19. Влияние иммунизации мышей эритроцитами барана на синтез ДНК, РНК и белка в клетках селезенки (Moav *et al.*, 1973)

1 — включение ^3H -тимидина в ДНК;

2 — включение ^3H -уридина в РНК;

3 — включение ^3H -аминокислот в белки.

По оси абсцисс — время после иммунизации, часы; по оси ординат — радиоактивность ДНК, РНК или белка, в имп/мин на 10^6 клеток

основаны главным образом на избирательной сорбции клеток, несущих поверхностные иммуноглобулины, а основные продуценты антител (иммуноглобулинов) их практически лишены (Askonas, 1975).

Для ряда исследований чрезвычайно удобной моделью оказались плазматические опухоли мышей. В течение долгого времени считалось, что спонтанные опухоли этого типа у мышей крайне редки. Первый случай трансплантируемой плазмоцитомы был описан в 1951 г. Но уже к 1960—1962 г. Поттер и другие исследователи разработали относительно простую методику индукции плазмоцитом у мышей (см. Potter, 1972), позволившую в короткие сроки получить набор трансплантируемых миелом, продуцирующих различные классы иммуноглобулинов. Часть этих белков обладает антительной активностью, часть лишена ее и, по-видимому, представляет собой неспецифические иммуноглобулины. Продукция иммуноглобулинов в плазматических опухолях составляет в среднем 5—40% от всех синтезируемых клетками белков (Baumal, Scharff, 1973). Для изучения механизмов биосинтеза иммуноглобулинов эта система обладает следующими преимуществами перед нормальными лимфоидными тканями.

1. Плазмоцитомы значительно более гомогенны по своему составу, соответственно и продуцируемые ими белки более гомогенны, чем нормальные иммуноглобулины или антитела. Следует отметить, что представления о гомогенности миеломных клеток не нужно абсолютизировать. На самом деле любая плазмоцитома (как и любой клеточный клон) представляет собой совокупность клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки и выполняющих разные функции. По-видимому, и продукты их деятельности неодинаковы. Так, иммуноглобулины удается обнаружить лишь в 50% клеток плазмоцитомы X5563 (Rifkind *et al.*, 1962). Антиидиотипической сывороткой к белку МОРС 315 удается осадить не более 50% секретируемого клетками иммуноглобулина (Sirisinha, Eisen, 1971). В моноклональных компонентах макроглобулина человека обнаружены различия в первичной структуре Н- и L-цепей (Hannestad, Sletten, 1971). Наконец, недавно обнаружены фенотипические изменения миеломных белков (Hausman, Rosma, 1975).

2. Несмотря на то что относительный синтез иммуноглобулинов в миеломных клетках не превышает таковой в селезенке, и особенно в лимфоузлах иммунизированного животного (Becker *et al.*, 1970), трансплантируемые миеломы позволяют получать значительно большие

количества материала для анализа (вес одной опухоли, перевитой под кожу мыши, может достигать 1/3 веса животного, в то время как вес селезенки не превышает 0,2 г).

3. Наконец, в ряде случаев в клетках плазмцитом активность нуклеаз ниже, чем в селезенке или лимфоузлах иммунизированных животных, а в некоторых из них, по-видимому, даже содержится ингибитор РНКазы (см. Сидорова, 1974), что представляет известные преимущества при фракционировании клеток и выделении из них полирибосом. Все это сделало плазмцитомы основным объектом при изучении механизмов синтеза и сборки полипептидных цепей иммуноглобулинов.

III.2. МЕХАНИЗМЫ БИОСИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ. РОЛЬ ПОЛИРИБОСОМ

Исследования биосинтеза иммуноглобулинов начались с выяснения роли отдельных субклеточных фракций в этом процессе. Подробно история вопроса была нами освещена ранее (Сидорова, 1974), поэтому сейчас мы кратко остановимся лишь на основных полученных при этом результатах.

III.2.1. Выделение полирибосом

Уже к середине 60-х годов иммуногистохимическими и электронно-микроскопическими исследованиями было показано, что в клетках, активно продуцирующих иммуноглобулины (в том числе антитела), имеется мощно развитый эндоплазматический ретикулум и содержатся скопления рибосом (до 18—25 в каждом). Наличие иммуноглобулинов в микросомах лимфоузлов иммунизированных животных и миеломных клеток подтверждалось также опытами по прямому фракционированию тканей (Swenson, Kern, 1967a). Однако выделить полирибосомы из лимфоидных клеток и продемонстрировать их способность к синтезу иммуноглобулинов *in vitro* в течение довольно долгого времени не удавалось.

Серьезное изучение механизмов синтеза иммуноглобулинов стало возможным лишь после того, как была разработана техника получения нативных полирибосом. Основные усилия при этом направлялись к уменьшению деградации полирибосом под действием эндогенной РНК-азы. В некоторых случаях удавалось резко снизить ее влияние за счет чрезвычайно мягких условий гомогенизации ткани, не вызывающих разрушения лизосом и высвобождения ферментов в гомогенат (Becker, Rich, 1966). Однако в большинстве случаев действие РНКазы стараются затормозить добавлением ингибиторов. К числу последних относятся цитоплазматические экстракты из клеток печени или HeLa, полисульфаты и сорбенты — макалоид и бентонит (см. Сидорова, 1974). В последние годы в качестве ингибитора РНКаз все чаще используют гепарин (Schlechter, 1974a, b). Оптимальные результаты достигаются при сочетании мягких условий разрушения тканей с добавлением ингибиторов и максимально быстром проведении фракционирования гомогената при 0° С.

В настоящее время для выделения полирибосом из лимфоидных тканей и миеломных опухолей обычно используют гомогенизацию их в трис-буферных растворах (рН 7,0—7,6), содержащих сахарозу, KCl (или реже — NaCl), $MgCl_2$ (или ацетат магния) и какой-нибудь из ингибиторов РНКазы (чаще — гепарин). Необходимым условием является использование реактивов, не содержащих РНКазы. Из гомогената сначала удаляют ядра и митохондрии, к постмитохондриальному супернатанту добавляют какой-либо из детергентов (дезоксихолат натрия, или тритон X-100), растворяющий мембраны эндоплазматического ретикулума, и полирибосомы осаждают (или фракционируют) в ступенчатом (0,5—1,5 М) или линейном (обычно 15—30%-ном) градиентах сахарозы. Выход полирибосомного материала составляет при этом 30—50% от числа всех клеточных рибосом.

На степень нативности полирибосом, получаемых из разных источников, влияют концентрация сахарозы, ионная сила и рН буферного раствора, соотношение K/Mg и природа используемого детергента. Так, для получения полирибосом из селезенки предпочтительнее использовать тритон X-100, так как в присутствии дезоксихолата натрия отмечалась их деградация. В некоторых случаях рекомендуется также добавление небольших количеств $CaCl_2$ или спермидина, повышающих стабильность клеточных ядер (Горюнова и др., 1974; Wall e. a., 1977), и 2-меркаптоэтанола (Schechter, 1973). С целью сократить время контакта полирибосом с клеточным лизатом можно также сразу наносить клетки на содержащий ингибитор детергент, наслоненный прямо на сахарозный градиент. В этом случае при центрифугировании клетки одновременно и лизируются, и фракционируются (Davis e. a., 1969).

Необходимо отметить, что выделение нативных полирибосом из клеток нормальных лимфоидных тканей или тканей иммунизированных животных является значительно более сложной и менее разработанной процедурой, чем выделение их из плазмоцитов. Возможно, это связано с тем, что в плазмоцитомах имеется эндогенный ингибитор РНКазы, в то время как в селезенке и лимфоузлах его нет, а активность РНКазы при иммунизации даже возрастает. Существенную роль, по-видимому, играет и вид животного. Наиболее благоприятными объектами, по ряду данных, являются селезенка и лимфоузлы крысы, из которых удается получить нативные полирибосомы, седиментирующие при 250—350S и 160—190S и активно включающие пульсовую аминокислотную метку (Vassalli, 1967; Васильченко и др., 1969). Имеются также сообщения о выделении нативных полирибосом из селезенки кроликов (Becker, Rich, 1966; Scharff, Uhr, 1965) и морских свинок (Николаева, 1976). Из опухолевых тканей наиболее богатым источником полирибосом являются миеломы; в лимфомах количество этих органелл меньше (Sherr, Uhr, 1971a).

В результате усовершенствования техники фракционирования из лимфоидных тканей животных и клеток мышинных плазмоцитов удалось выделить широкий спектр полирибосом с константами седimentации от 118S до 350S (см. Сидорова, 1974). Было показано, что при иммунизации количество полирибосом в полтора-два раза возрастает (Moav, Harris, 1970; Юрин, 1971), а распределение их приобретает специфический бифазный характер (рис. 20). Аналогичные данные на клетках миелом были получены Шубертом (Schubert, 1968) и нами (Сидорова и др., 1973).

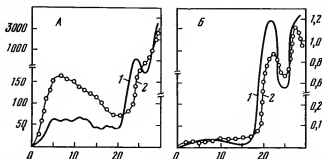


Рис. 20. Распределение материалов из экстрактов лимфоузлов кроликов в градиенте плотности сахарозы у иммунизированных (А) и неиммунизированных (Б) животных (Becker, Rich, 1966)

1 — поглощение УФ-света при длине волны 260 нм (A_{260}); 2 — включение импульсной аминокислотной метки. По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — радиоактивность фракций, в имп./мин (слева), поглощение УФ-света, A_{260} (справа)

Возникло предположение, что бифазное распределение полирибосом, меченных по растущим полипептидным цепям, отражает наличие двух классов полирибосом, участвующих в синтезе Н- и L-цепей. Опытами с иммунопреципитацией полирибосом антисыворотками к Н- и L-цепям действительно было показано, что Н-цепи обнаруживаются только на полирибосомах 270-300S, а L-цепи — преимущественно на полирибосомах 180-190S (Shapiro e. a., 1966a; Askonas, Williamson, 1967b). Согласно проведенным авторам расчетам, такие полирибосомы должны были содержать мРНК, состоящие приблизительно из 1250 и 500 нуклеотидов, т. е. вполне пригодные для кодирования синтеза Н- и L-цепей.

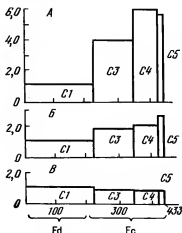
Полученные данные позволили сделать два принципиально важных вывода, а именно: 1) синтез иммуноглобулинов носит моноисторный характер и 2) размеры полирибосом и мРНК, участвующих в образовании Н- и L-цепей, вполне достаточны для кодирования синтеза каждой из них как единого целого.

III.2.2. Синтез тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов как единого целого. Время образования

Специальное исследование этих вопросов было проведено в опытах на клетках лимфоузлов иммунизированного кролика (Fleischman, 1967) и миеломных клетках мыши (Kporf e. a., 1967), меченных пульсовой аминокислотной меткой. Через различные сроки инкубации клеток с 3 Н-лейцином из них выделяли Н-цепи, расщепляли на фрагменты (цианогенбромидом в случае иммуноглобулина кролика или папанном в случае миеломного иммуноглобулина) и определяли отношение радиоактивности этих фрагментов. Было показано, что соотношение радиоактивности NH_2 -концевого фрагмента (Fd) и COOH -концевого фрагмента (Fc), относительно низкое при 1-2-минутной метке, возрастает до 80% при 8-минутной. Аналогичные результаты были получены и при сопоставлении активностей NH_2 - и COOH -концевых пептидов Н-цепей кролика (рис. 21). Обнаруженное распределение пульсовой метки в

Рис. 21. Удельная радиоактивность цианогенбромидных фрагментов тяжелой цепи кролика при разных сроках инкубации с радиоактивной меткой (Fleischman, 1967)

А — 30 сек; Б — 1 мин; В — 4 часа. По оси абсцисс — положение аминокислотных остатков в полипептидной цепи (Fd- и Fc-фрагментах); по оси ординат — удельная радиоактивность (за единицу принята удельная активность фрагмента C1)



молекуле Н-цепи соответствовало предположению о синтезе ее из одной исходной точки. В этом случае в первую очередь должны метиться достраивающиеся участки цепи, т. е. пептиды СООН-конца; постепенно радиоактивность NH_2 - и СООН-концевых пептидов должна выравниваться, что и было обнаружено в опытах.

Данные, подтверждающие предположение о синтезе каждой из цепей как единого целого были получены и при изучении сходными методами синтеза Н- и L-цепей в бесклеточной системе (Vassalli e. a., 1971). (Необходимо отметить, что сделанный вывод не является бесспорным. Так, наблюдаемое неравномерное распределение метки можно было бы объяснить, предположив, что в клетках имеется небольшой пул V-областей, СООН-концевой участок которых очень быстро соединяется с NH_2 -концами связанных на полирибосоме С-областей. Такая возможность, в частности, вытекала из опытов Шуберта и Кона, обнаруживших в миеломных клетках синтез половинок L-цепей (Schubert, Cohn, 1970). Однако данные о необычайной легкости гидролиза L-цепи под влиянием протеолитических ферментов (Solomon, McLaughlin, 1969) и даже в присутствии слабых кислот (Fraser e. a., 1972) позволяют предполагать, что в описанных опытах наблюдался скорее распад L-цепи, чем ее синтез из двух половинок).

В последние годы вывод об инициации синтеза Н- и L-цепей из одной точки подтвержден рядом косвенных данных. К их числу относятся обнаружение в моче и крови миеломных больных «дефектных» Н-цепей, сохраняющих всего 17—18 NH_2 -концевых, но свыше 200 СООН-концевых аминокислот (Frangione, 1976). Таким образом, в этих цепях недостает 100 остатков V_H -области и 100 остатков C_H -области. Совершенно невероятно, чтобы обе делеции произошли до объединения V- и С-генов, кодирующих Н-цепь, в каждом из них самостоятельно. Поэтому наличие таких «дефектных» Н-цепей подтверждает предположение о синтезе их как единого целого из одной исходной точки.

Следующим доводом является обнаружение иницирующего метионина только на NH_2 -конце предшественников L-цепей (Schechter, Burstein, 1976) и отсутствие метиониловых остатков в 107—109-м положениях L-цепей (Wu, Kabat, 1970).

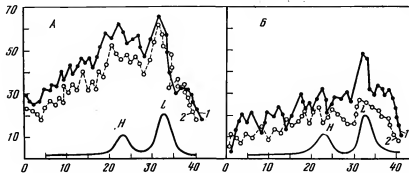


Рис. 22. Распределение метки в полипептидных цепях иммуноглобулинов, растущих на 270 S (А) и 190 S (Б) полирибосомах, через 15 (1) и 30 (2) сек после введения импульсной метки и переноса клеток в среду, содержащую 200-кратный избыток немеченых аминокислот (Shapiro *et al.*, 1966a)

Нижняя кривая — «свидетель», распределение Н- и L-цепей иммуноглобулина. По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — радиоактивность фракций, в кмп/мин

Наконец, в подтверждение этого взгляда можно привести данные, о размерах мРНК, кодирующих синтез Н- и L-цепей, полученные в последние годы (см. раздел III.3.3), о наличии в таких мРНК нуклеотидов, соответствующих аминокислотным последовательностям как V-, так и С-областей Н- и L-цепей (Brownlee *et al.*, 1973; Cowan *et al.*, 1976), и о возможности выделения мРНК, кодирующей L-цепь, из полирибосом, специфически осажденных антителами как к V-, так и к С-областям (Schechter, 1974b).

Представляло интерес определить примерное время синтеза и выхода тяжелых и легких цепей с полирибосом. Для этого клетки (миелома МРС₁₁) метили в течение 90 сек смесью меченых аминокислот, помещали затем в среду, содержащую 200-кратный избыток немеченых аминокислот, выделяли через различные промежутки времени тяжелые и легкие полирибосомы и определяли количество метки, оставшееся на полирибосомах и перешедшее в среду. Полученные результаты приведены на рис. 22. Из рисунка видно, что с легких полирибосом метка «сходит» примерно в два раза скорее, чем с тяжелых. Соответственные времена синтеза были определены равными 30—45 и 60—75 сек. Таким образом, за время образования одной тяжелой цепи могут образоваться две легкие, т. е. различия в скоростях синтеза, казалось бы, должны приводить к избыточному образованию легких цепей в клетке. Следует, однако, помнить о том, что полирибосомы, участвующие в синтезе Н-цепей, примерно в два раза больше полирибосом, на которых синтезируются L-цепи. Это, в свою очередь, может привести к тому, что после короткого начального периода несбалансированного синтеза Н- и L-цепей наступит состояние, при котором число синтезируемых в единицу времени легких цепей будет равняться числу тяжелых.

Избыточный синтез L-цепей и выход их во внеклеточную среду был обнаружен в ряде работ, проведенных на клетках лимфоузлов и селезенки кроликов (Незлин, Кульпина, 1966; Shapiro *et al.*, 1966b; Скворцов, Гурвич, 1968) и на клетках некоторых мышинных миелом (Schubert,

1968; Bauml, Scharff, 1973). С другой стороны, в опытах с клетками миеломы X5563 и лимфоузлов мыши Асконас и Вильямсон (Askonas, Williamson, 1967a) не смогли обнаружить значительного избытка свободных легких цепей и секретиции их из клеток.

В ряде случаев удалось показать, что избыточные L-цепи разрушаются внутри клеток (Schubert, 1968; Bauml, Scharff, 1973); описано также разрушение H-цепей при аномальном синтезе клетками вариантного миеломного клона только тяжелых цепей (Bauml, Scharff, 1976).

Полученные данные представляют значительный интерес, так как позволяют ставить вопросы о времени жизни полирибосом и мРНК разного размера, о количестве матриц для H- и L-цепей и о том, сколько раз может служить матрицей одна и та же мРНК, о числе генов, кодирующих соответственные мРНК, о различиях в скоростях их транскрипции и трансляции, об эффективности связывания различных мРНК с рибосомами и, наконец, о наличии видовых различий во времени жизни мРНК у животных.

III.2.3. Роль мембранного компонента в синтезе иммуноглобулинов

В клетках нормальных лимфоидных тканей и в клетках миелом (как и во всех клетках) имеется два класса полирибосом — свободные и связанные с мембранами эндоплазматического ретикула (микросомы). Обнаружение полипептидных цепей иммуноглобулина в цистернах эндоплазматического ретикула и данные по фракционированию клеток (Swenson, Kern, 1967a) свидетельствовали о том, что вновь синтезированные иммуноглобулины практически целиком связаны с мембранами, главным образом шероховатыми. Прямые доказательства были получены в опытах трех типов. В первую очередь об этом свидетельствовали данные по изучению синтеза иммуноглобулинов в «естественных» бесклеточных системах, т. е. системах, полученных из клеток, продуцирующих иммуноглобулины.

Первые попытки воспроизведения синтеза иммуноглобулинов в таких системах предпринимались еще в 60-х годах, но оказались безуспешными. Только в 1967 г. одновременно двум группам исследователей — Р. С. Незлину с Л. М. Кульпиной в СССР и Вассалли с сотрудниками за рубежом — удалось получить из клеток селезенки и лимфоузлов крыс бесклеточные системы, в которых наблюдалось включение меченых аминокислот в H- и L-цепи (Nezlin, Kulpina, 1967; Vassalli e. a., 1967). Функциональными единицами в этих опытах являлись микросомы. В последующие годы был описан еще ряд активных бесклеточных систем, полученных как из нормальных лимфоидных, так и из миеломных тканей. В ряде случаев в них использовали уже не микросомы, а выделенные из них полирибосомы (см. Сидорова, 1974).

Проведенные опыты показали, что в системе *in vitro* связанные с мембранами полирибосомы включают меченые аминокислоты в H- и L-цепи иммуноглобулинов и антител, причем по крайней мере часть H- и L-цепей не просто «достраиваются», но синтезируются *de novo*. На свободных полирибосомах получить синтез иммуноглобулинов не удалось (Pruete e. a., 1973).

Вторая группа данных о синтезе иммуноглобулинов связанными с мембранами полирибосомами получена в опытах с пульсовой меткой клеток аминокислотами, выделением из них свободных и связанных полирибосом и определением на тех и других растущих Н- и L-цепей (Sherr, Uhr, 1970, 1971b). Результаты таких опытов приведены в табл. 8.

Таблица 8

Содержание радиоактивного IgG на свободных и связанных полирибосомах из миеломных клеток РЗК и клеток лимфоузла иммунизированного кролика (Cherr, Uhr, 1970, 1971b).

Полирибосомы	Включение метки в тотальные растущие пептиды, нмп/мин	Включение метки в IgG, нмп/мин	Содержание IgG, %
Клетки РЗК			
Свободные	1 270 000	85 920	6,8
Связанные	375 000	76 940	20,5
Свободные	103 000	5 270	5,1
Связанные	51 110	19 080	37,3
Клетки лимфоузла			
Свободные	134 000	62 225	4,6
Связанные	18 900	2 555	13,5
Свободные	714 000	31 790	4,5
Связанные	164 500	22 295	13,6

Примечание. Включение метки в растущие на полирибосомах пептиды в контроле составляло 3—4 %; таким образом, содержание IgG на свободных полирибосомах на самом деле было в 3—10 раз ниже, чем на связанных.

Наконец, последняя группа доказательств сводится к тому, что синтез L-цепи в искусственной бесклеточной системе (содержащей рибосомы, выделенные из клеток, не продуцирующих иммуноглобулины) удается получить лишь при добавлении мРНК, полученной из связанных с мембранами (но не из свободных) полирибосом (Swan e. a., 1972; Tonegawa, Baldi, 1973).

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить, что синтез иммуноглобулинов в нормальных лимфоидных тканях и в клетках миелом осуществляется главным образом полирибосомами, связанными с мембранами эндоплазматического ретикулама.

Связанные полирибосомы составляют не более 50% всех рибосом клетки (Kimmel, 1969), способность же их к синтезу иммуноглобулинов в бесклеточной системе в 3—10 раз выше, чем у свободных. Почему же так существенна связь полирибосом с мембранами? Опытами Бивена (Bevan, 1971a) и Вассалли и сотрудников (Vassalli e. a., 1971) было показано, что вновь синтезированные иммуноглобулины переносятся с полирибосом не в клеточный сок, а в микросомальные везикулы и что этот векторный перенос обуславливается именно наличием мембранного компонента. Таким образом, сегрегация иммуноглобулинов от других клеточных белков осуществляется еще во время их синтеза. Следует отметить, что это не является специфичным только для иммуноглобу-

линов. Целый ряд данных свидетельствует о том, что белки, предназначенные на экспорт, синтезируются связанными полирибосомами, а остающиеся в клетке и идущие на ее локальные нужды — свободными (Campbell, 1970).

Конкретные механизмы, обеспечивающие связь полирибосом, синтезирующих секретрируемые белки, с мембранами, не выяснены. Имеющиеся на этот счет предположения носят предварительный характер. Часть исследователей считают, что основную роль в этом процессе играет структура соответствующих мРНК (Bretscher, 1973; Горюнова и др., 1975). Действительно было показано (Kimmel, 1969), что обработка клеток РНКазой приводит не только к разрушению мРНК и деградации полирибосом, но и нарушает их связь с мембранами. Согласно предположению, высказанному Л. Е. Горюновой с соавторами, различны уже пути транспорта мРНК, кодирующих синтез секретрируемых и несекретрируемых белков, из ядра в цитоплазму. С другой стороны, высказывались предположения о том, что связь полирибосом с мембранами осуществляется с помощью NH_2 -концевых экстрапептидов растущих цепей (Milstein e. a., 1972) или за счет углеводных компонентов (Swenson, Kern, 1967b).

О функции мембранного компонента в настоящее время известно очень немного. Сопоставление синтеза иммуноглобулинов в системах, содержащих микросомы или выделенные из них полирибосомы, показало, что мембранный компонент играет роль в инициации образования полирибосомного комплекса (Abraham e. a., 1974), в превращении предшественников L-цепей в зрелые цепи (Milstein e. a., 1972) и в сборке H- и L-цепей в молекулу иммуноглобулина (Vassalli e. a., 1971). По-видимому, в мембранах имеются факторы, как угнетающие, так и стимулирующие синтез белков, в том числе и иммуноглобулинов. По данным Вассалли (Vassalli, 1967), к числу факторов, угнетающих синтез иммуноглобулинов, может относиться, в частности, АТФаза, активность которой в микросомах селезенки и лимфоузлов крыс в 15—20 и 7 раз выше, чем, например, в микросомах печени. Это может приводить к нарушению образования аминоацил-тРНК и ускорению деацилирования преформированного комплекса аминоацил-тРНК. Помимо этого, в микросомальной мембране содержится и какой-то фактор, угнетающий реакцию переноса аминокислот с тРНК на рибосомы. Этот фактор удается обнаружить в солюбилизированной мембране. К числу содержащихся в мембранах промоторов синтеза иммуноглобулинов относятся трансфераза I, способствующая присоединению аминоацил-тРНК к акцепторному участку на малой рибосомной субъединице, и трансфераза II, осуществляющая транслокацию пептидил-тРНК с акцепторного участка на соответствующий пептидиловый центр большой субъединицы. Наконец, в мембранах же содержатся все ферменты, осуществляющие гликозилирование иммуноглобулинов (Melchers, 1973).

Таковы основные результаты исследований, полученные на естественных бесклеточных системах. Очевидно, возможности, представляемые такими системами, далеко не исчерпаны, однако в последние годы «центр тяжести» переместился на искусственные системы. Этому в значительной степени способствовало развитие техники фракционирования нуклеиновых кислот и трансляции их в различных бесклеточных системах.

III.3. РНК, КОДИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Выделение нативных полирибосом, синтезирующих иммуноглобулины, позволяло перейти к прямому исследованию размеров и структуры мРНК, кодирующих синтез полипептидных цепей иммуноглобулинов. Впервые это было сделано на клетках мышиной плазмоцитомы MPC₁₁ (Shapiro e. a., 1966a). Для определения размеров мРНК клетки метили 10—15 мин ³H-уридином, выделяли из них 270S- и 190S-полирибосомы, экстрагировали из последних РНК и фракционировали ее в градиенте плотности сахарозы. Быстрометящиеся РНК из 270S- и 190S-полирибосом обладали константами седиментации 14—16S и 9—11S соответственно.

Эти опыты положили начало целой серии исследований структуры и свойств мРНК, кодирующих цепи иммуноглобулинов. Они легли в основу исследования молекулярных механизмов синтеза иммуноглобулинов.

III.3.1. Выделение мРНК

Первоочередной задачей проводимых исследований являлось выделение индивидуальных мРНК, ответственных за синтез Н- и L-полипептидных цепей иммуноглобулинов. Наиболее удобным объектом для этого оказались миеомы, продуцирующие L-цепи.

В настоящее время наметилось два подхода — химический и иммунохимический. В основе первого лежит химическое фракционирование мРНК, выделенных из клеток, продуцирующих иммуноглобулины. Основными этапами являются: выделение из миеомных клеток микросом или связанных с мембранами полирибосом (Stavnezer e. a., 1971; Milstein e. a., 1972); экстракция из них РНК в условиях, предупреждающих их деградацию; фракционирование РНК в градиенте плотности сахарозы; выделение фракций, соответствующих по размерам предполагаемой мРНК; очистка их от рибосомальных РНК на колонках с олиго(dT)- или поли(У)-целлюлозой (или сефарозой)¹, задерживающих только богатые адениловыми основаниями мРНК (полиА-мРНК), и исследование биологической активности выделенных фракций. В ряде случаев для дополнительной очистки препаратов мРНК используется электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии 99%-ного формамида (Farace e. a., 1976; Matthysens e. a., 1976). С теми или иными вариациями приведенная выше схема используется в настоящее время подавляющим большинством исследователей. Выход индивидуальной полиА-мРНК обычно составляет 0,01% от внесенного количества РНК (Brownlee e. a., 1973). В результате в настоящее время выделено из плазмоцитом МОРС 70Е, МОРС 21, МОРС 41 несколько мРНК, кодирующих как Н-, так и L-цепи. Чистота большинства этих препаратов не

¹ В ряде случаев последовательность обратная: сначала фракционирование на полиА-содержащую и полиА-несодержащую РНК, а потом фракционирование в градиенте плотности сахарозы (Swan e. a., 1972; Mach e. a., 1973; Storb, Marvin, 1976).

превышает 40—60% (Bernardini, Tonegawa, 1974; Faust e. a., 1974; Rabbitts e. a., 1974; Tonegawa e. a., 1974b; Cowan e. a., 1976; Farace e. a., 1976).

Лишь одной группе авторов удалось недавно таким способом получить мРНК более чем 90%-ной чистоты (Matthyssens e. a., 1976). Это не удивительно. Используемый метод основан, во-первых, на разделении молекул РНК по их молекулярному весу и, во-вторых, на отделении популяции полиА-содержащих РНК от лишенной ее. Естественно, что в клетках может присутствовать ряд мРНК с аналогичными свойствами, не имеющих отношения к иммуноглобулинам. Все эти РНК неизбежно будут загрязнять препараты индивидуальной иммуноглобулиновой РНК. Очевидно, что в зависимости от относительной доли синтезируемого клетками иммуноглобулина этих примесей будет либо больше, либо меньше. Поэтому для выделения мРНК из миелом, синтез иммуноглобулинов в которых достигает 30—40% от синтеза всех белков вообще, этот метод может быть использован; в то же время для выделения мРНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов, из нормальных лимфоидных тканей, особенно из чрезвычайно гетерогенной по клеточному составу селезенки, он явно непригоден.

Значительно более перспективным, с нашей точки зрения, является иммунохимический подход к решению этой проблемы. Преимущество его заключается в том, что уже первый этап фракционирования предполагает строго специфическое выделение индивидуальных полирибосом с помощью антител к синтезируемому этими полирибосомами белку. Существует три варианта этого метода. Первый — осаждение полирибосом антителами к синтезируемому ими белку в присутствии носителя, т. е. того же самого белка (копреципитация) (Delovitch e. a., 1972; Laskov, Mitelman, 1975). Второй — обработка полирибосом антителами к синтезируемому ими белку и осаждение полученного комплекса антисывороткой к антителам (непрямая преципитация) (Schechter, 1973, 1974a). И третий — извлечение индивидуальных полирибосом с помощью иммуносорбентов, содержащих ковалентно или нековалентно связанные антитела к синтезируемому на полирибосомах белку (Сидорова и др., 1973; Sidorova e. a., 1974; Любимова и др., 1975). Из полученных таким образом индивидуальных полирибосом тем или иным способом экстрагируют полисомные РНК и извлекают мРНК, пропуская эту смесь через колонки с олиго(dT)-(Schechter, 1973) или поли(У)-целлюлозой (Любимова и др. 1975). С помощью иммунохимического подхода удалось получить препараты мРНК примерно 95%-ной чистоты (Schechter, 1973; Shapiro e. a., 1974).

III.3.2. Трансляция мРНК в бесклеточных системах

Биологическая активность выделенных препаратов мРНК оценивается по их способности синтезировать в бесклеточных системах соответствующие полипептидные цепи. Определяя величину синтеза специфических пептидов по отношению ко всем вновь синтезированным, можно определить также чистоту препарата мРНК. Необходимым условием при этом является использование для мечения белка не какой-нибудь одной аминокислоты, но смеси по меньшей мере из 10 радиоактивных аминокислот и анализ продуктов синтеза методами

с высокой разрешающей способностью (например, двумерное картирование пептидов).

Для трансляции мРНК используют бесклеточные системы трех типов: из асцитной гепатомы Кребса (Swan e. a., 1972; Schechter, 1973), ретикулоцитов кролика (Stavnezer, Huang, 1971; Mach e. a., 1973; Cowan e. a., 1976) и проростков пшеницы (Schechter, Burstein, 1976; Storb, Marvin, 1976). Наиболее удобной, по-видимому, является последняя система. Выход меченого предшественника в ней составляет 0,1 пмоль, или 2,6 нг на 0,007 А₂₆₀ единиц внесенной мРНК (Schechter, Burstein, 1976).

Поскольку на данном этапе задачей описываемых исследований является изучение потенциальной трансляционной способности мРНК, а растительные и животные бесклеточные системы в принципе ведут себя в этом отношении одинаково (Schechter, Burstein, 1976), то степень пригодности и преимуществ той или иной системы, очевидно, определяется следующими тремя параметрами: величиной эндогенного белкового синтеза (чем ниже, тем лучше), доступностью и простотой требуемых ингредиентов и количеством мРНК, которую надо внести в систему для получения достоверного синтеза исследуемого белка.

Аналогом бесклеточной системы иногда служат также ооциты лягушки. Было показано (Smith e. a., 1973), что введение в ооциты мРНК, кодирующей цепи иммуноглобулинов, приводит к синтезу этих цепей. Этот метод, однако, более сложен и требует значительных количеств мРНК.

Большинство опытов по трансляции проведено с мРНК, которые кодируют синтез L-цепей (L-мРНК), так как их выделение значительно проще, чем выделение мРНК, кодирующих синтез H-цепей (H-мРНК). Изучение продуктов трансляции мРНК, кодирующих L-цепи миеломных иммуноглобулинов, привело к неожиданному результату. Оказалось, что в бесклеточных системах мРНК кодируют синтез полипептидов (предшественников), больших по размерам, чем зрелые L-цепи. Впервые образование более тяжелого продукта под действием 13S мРНК из клеток плазмцитомы МОРС 41 описали Сван и соавторы (Swan e. a., 1972), под действием 10—14S мРНК из клеток плазмцитомы МОРС 21—Мильштейн и соавторы (Milstein e. a., 1972). Молекулярный вес образующегося продукта был больше молекулярного веса соответствующих L-цепей (на 1500), из чего было сделано заключение о наличии в нем 15 дополнительных аминокислотных остатков. Поскольку при добавлении к бесклеточной системе ³⁵S-формилметионин-тРНК в качестве единственного источника метки ³⁵S-метионин обнаруживался в тяжелом компоненте, было сделано заключение, что по крайней мере часть этих дополнительных аминокислот расположена на NH₂-конце молекулы L-цепи (у эукариотов синтез полипептидных цепей начинается с включения метионина). В дальнейшем данные о синтезе предшественника были подтверждены в опытах с мРНК, кодирующими синтез κ -L-цепей МОРС 70E (Tonegawa, Baldi, 1973), MPC_{II} (Storb, Marvin, 1976), МОРС 41 (Mach e. a., 1973), МОРС 321 (Schechter, Burstein, 1976), МОРС 63 (Schechter e. a., 1976) и λ -L-цепей МОРС 104E (Burstein e. a., 1976).

Предшественник L-цепи удается обнаружить также в бесклеточной системе, содержащей полирибосомы из клеток МОРС 21, хотя в системах, содержащих микросомы (Milstein e. a., 1972) или ооциты лягушки

(Faust e. a., 1974), обнаруживаются только зрелые L-цепи. Таким образом, превращение предшественника в L-цепь, по-видимому, является функцией эндоплазматического ретикулаума. Недавно синтез предшественника L-цепи удалось выявить и в целых клетках (Schmeckrper e. a., 1975).

В настоящее время исследована структура нескольких предшественников. Сравнительные размеры и частичная последовательность аминокислот в NH_2 -концевых экстрапептидах предшественников легких цепей иммуноглобулинов (Burststein e. a., 1976; Burststein, Schechter, 1976) представлены ниже.

Мет x	Мет	x	x	x	x	Лей	Лей	Лей	x	x	Лей	Лей	Лей	x	x	Про	x	Сер	x	x	МОРС 63	}	тип Ж
	Мет	x	x	x	x	Лей	Лей	Лей	x	x	Лей	Лей	Лей	x	x	Про	x	Сер	x	x	МОРС 321		
	Мет	x	Ала	Про	Ала	x	Изолей	x	x	x	Лей	Лей	Лей	Лей	x	Про	x	x	x	x	МОРС 41		
	Мет	x	Ала	Про	Ала	x	Изолей	x	x	x	Лей	Лей	Лей	Лей	x	Про	x	x	x	x	МОРС 41		
Мет	Ала	x	x	x	Лей	x	Лей	x	Лей	Лей	Ала	Лей	x	x	x	Ала	x	x	x	МОРС 104Е	}	тип Ж	
	Мет	Ала	x	x	Лей	x	Лей	x	Лей	Лей	Ала	Лей	x	x	x	Ала	x	x	МОРС 104Е				

Функции экстрапептидов пока неясны. Возможно, они состоят в обеспечении взаимодействия синтезирующихся цепей с мембранами эндоплазматического ретикулума, а может быть, и с клеточной поверхностью. Если последнее справедливо, то экстрапептиды могут служить и дополнительным механизмом распознавания. С другой стороны, судя по данным Мильштейна и соавторов (Milstein *et al.*, 1972), в микросомальной мембране содержится фермент, быстро отщепляющий экстрапептиды. Это указывает на то, что они играют роль лишь на самых начальных этапах векторного переноса цепей в микросомальные везикулы.

Очевидно, следует ожидать обнаружения NH_2 -концевых экстрапептидов и в Н-цепях. Некоторым указанием на это служит обнаружение необычных пептидов в Н-цепях IgA ламбда-типа (Barstad *et al.*, 1974). и IgG3 (Dammacco *et al.*, 1972).

Чрезвычайно интересно было бы также проверить, имеются ли экстрапептиды не только в миеломных, но и в нормальных иммуноглобулинах и в антителах и различны ли они в антителах с разной специфичностью. До сих пор исследован только один миеломный белок с антительной активностью — МОРС 104Е.

Все вышесказанное свидетельствует о том, что трансляция мРНК в искусственных бесклеточных системах привела к обнаружению ранее неизвестных этапов синтеза иммуноглобулинов и поставила перед исследователями ряд новых вопросов.

III.3.3. Структура и свойства мРНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов

Выделение относительно чистых препаратов мРНК позволило перейти к прямому изучению их физико-химических свойств и структуры. Сразу же обнаружилось, что константы седиментации, а следовательно, и молекулярные веса и размеры мРНК, кодирующих Н- и L-цепи, значительно выше ранее предполагавшихся (см. раздел III.2.1). Константы седиментации мРНК для Н-цепей определены равными 12—17S¹ (Namba, Hanaoka, 1969; Bernardini, Tonegawa, 1973; Cowan *et al.*, 1976), а для L-мРНК—12—15S (Tonegawa, Baldi, 1973; Mach *et al.*, 1973; Schechter *et al.*, 1976). Соответственно молекулярные веса этих мРНК составляют ~440 000 в случае L-мРНК, а не 220 000, как считалось ранее, и 650 000, а не 400 000 для Н-мРНК. Число нуклеотидов в L-мРНК составляет 1100—1250, а в Н-мРНК—1900.

Легко подсчитать, что для синтеза L-цепи, состоящей из 214 аминокислотных остатков, требуется всего ~650 нуклеотидов (м. в. 220 000). Для синтеза предшественника, содержащего дополнительно 20 NH_2 -концевых и 25 COOH -концевых аминокислотных остатков, требуется еще 60 и 75 нуклеотидов (м. в. 45 000). Итого для синтеза предшественника L-цепи достаточно 785 нуклеотидов, т. е. ~65% всех имеющихся в мРНК. Аналогично для синтеза Н-цепей, состоящих из 450 амино-

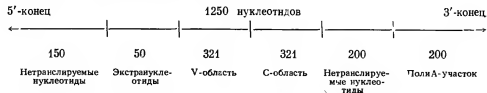
¹ Судя по тому, что мРНК, кодирующие L-цепи, имеют, как теперь известно, константы седиментации не менее 12S, можно думать, что и константы седиментации мРНК для Н-цепей окажутся выше принятых в настоящее время.

кислот, требуется 1350 нуклеотидов, а в мРНК, как мы видели, входит 1900. Таким образом, число экстрануклеотидов в этом случае составляет 650. Что же представляют собой «неиспользуемые» 30% нуклеотидов, где они расположены и какова их функция?

Изучение строения двух мРНК, кодирующих L-цепи (Brownlee *et al.*, 1973; Faust *et al.*, 1974), и одной мРНК, кодирующей H-цепь (Bernardini, Toneyawa, 1973, 1974) показало, что 200 нуклеотидов (м. в. 65000) в этих мРНК приходится на долю полиА-последовательности, расположенной на 3'-конце молекул. Функция их пока неясна. Очевидно лишь, что поскольку полиА-нуклеотиды обнаружены у всех исследованных до сих пор мРНК, кодирующих синтез белков как связанными, так и свободными полирибосомами (Rosenfeld *et al.*, 1972), то специального отношения к синтезу секретируемых белков вообще и иммуноглобулинов в частности они не имеют. Известно, что полиА-конец присоединяется к молекуле мРНК уже после завершения ее синтеза. Предполагается, что полиА-участок играет роль при транспорте мРНК из ядра в цитоплазму, однако наличие полиА-участка в вирусном геноме, реплицирующемся в цитоплазме, свидетельствует о том, что у полиА-нуклеотидов должны быть и другие функции. Не исключено, что участок полиА нужен для изменения вторичной и третичной структуры мРНК и повышения ее стабильности или для связывания мРНК с полирибосомами; может быть, он играет роль в трансляции мРНК, хотя однозначно это не доказано (Rosenfeld *et al.*, 1972).

Кроме 200 нуклеотидов, приходящихся на долю участка полиА, в L-мРНК остается еще 200 нуклеотидов, не транслируемых и неизвестно где расположенных. В принципе возможны три структуры мРНК, схематически представленные на рис. 23.

Начата и прямая расшифровка строения мРНК. Обработка ³²P-мРНК, кодирующей L-цепи МОРС 21, T₁-РНКазой и анализ полученных олигонуклеотидов позволили наряду с олигонуклеотидами, кодирующими V- и С-области и полиА-последовательность, выявить 52 нуклеотида из нетранслируемого участка 3'-конца (Milstein *et al.*, 1974). Размеры этого участка определены в 200 ± 50 нуклеотидов. Таким образом, распределение нуклеотидов в мРНК для L-цепи МОРС 21 выглядит сейчас следующим образом:



(т. е. аналогично структуре В на рис. 23). Расшифрованное строение 3'-конца мРНК приведено на рис. 24 (Proudfoot, Brownlee, 1974).

В L-цепевой мРНК из клеток МОРС 41 недавно были найдены незначительные количества N⁶-метилгуанозина и N⁷-метилгуанозина, расположенного на 5'-конце и связанного с соседними нуклеотидами 5',5'-пирофосфатной связью (Cory *et al.*, 1976). Сейчас известно, что наличие метилгуанидилового остатка на 5'-конце необходимо для стабилизации и трансляции мРНК у эукариотов (Shimotohno *et al.*, 1977).

Рис. 23. Возможные варианты (А—В) распределения нуклеотидных последовательностей в мРНК, кодирующей синтез легких цепей белка МОРС 321 (Schechter *е. а.*, 1976)

1 — экстрапетиды NH₂- и COOH-концов;
2 — V-область;
3 — С-область;
4 — нетранслируемый участок;
5 — полиА-участок

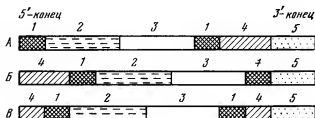
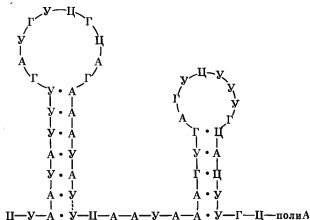


Рис. 24. Структура 3'-конца мРНК, кодирующей синтез легких цепей белка МОРС 21 (Proudfoot, Brownlee, 1974)



Данные по расшифровке строения мРНК носят предварительный характер. По свидетельству самих авторов, неточно определены размеры нетранслируемого участка на 5'-конце мРНК; пока только 194 нуклеотида удалось «приписать» кодируемой области белковой цепи, состоящей из 75 аминокислот (из 214 во всей L-цепи).

Сходная работа была проведена и с мРНК, кодирующей H-цепи МОРС 21 (Cowan *е. а.*, 1976). Использование одного из мутантов МОРС 21, синтезирующего H-цепи с делецией C_H1-домена, позволило расшифровать 18 олигонуклеотидов, содержащих 202 основания и принадлежащих как V-, так и С-областям. В H-мРНК также были обнаружены полиА- и нетранслируемые нуклеотиды.

Необходимо отметить, что принципиальное значение результатов, полученных в этих опытах, заключается еще и в том, что они окончательно решили вопрос о синтезе H- и L-цепей как единого целого и о слиянии информации о структуре V- и С-областей на уровне ДНК. Действительно, в L-мРНК удалось не только выявить последовательности нуклеотидов, кодирующие V- и С-области, и показать, что они расположены на одной молекуле, но даже выделить олигонуклеотид, кодирующий остаток 105—108, т. е. место сочленения V- и С-областей. Как мы видели ранее (раздел III.2.2), аналогичные данные были получены и с помощью другого подхода также на молекулярном уровне.

Кроме того, в пользу слияния V- и С-генов на уровне ДНК и считывания информации уже с таких объединенных генов, как с одного гена,

свидетельствуют опыты с соматическими гибридами клеток, продуцирующих иммуноглобулины, различающиеся по своим V- и С-областям (Margulies e. a., 1977; Milstein e. a., 1977). Ни в одном из таких опытов не наблюдалось образования рекомбинантных молекул, содержащих V-область, кодируемую одним партнером, а С-область, кодируемую другим.

III.3.4. Время жизни мРНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов

Время жизни мРНК в миеломиных и нормальных лимфоидных клетках определяют либо по кинетике включения метки в мРНК (Storb, 1973), либо по времени синтеза иммуноглобулинов после полного прекращения синтеза мРНК под действием специфических ингибиторов, чаще всего — актиномицина D. Полученные данные весьма противоречивы. Так, время жизни мРНК для миеломиных иммуноглобулинов, по данным разных авторов, колеблется от 1—4 час (Namba, Hanaoka, 1969; Shutt, Krueger, 1972) до 12—14 час (Cowan, Milstein, 1974) и 89 час (Storb, 1973). Время жизни H- и L-мРНК в миеломиных клетках, по-видимому, одинаково.

Определение времени жизни мРНК в нормальных тканях является еще более сложным делом, так как в силу гетерогенности системы в большинстве случаев неизвестно, к каким мРНК относятся полученные величины. Между результатами разных авторов здесь наблюдаются еще большие расхождения, чем в случае миеломиных мРНК. По-видимому, наиболее достоверными следует считать данные, полученные при исследовании действия актиномицина D на синтез РНК непосредственно в антителопродуцирующих клетках мышинной селезенки (Neyer, Busgard, 1972). В этих опытах было подсчитано, что время жизни тотальных мРНК селезенки равно примерно 2 час, а время жизни мРНК, кодирующих синтез гемоглобинов, — не менее 4 час. По некоторым другим данным, время жизни мРНК в клетках лимфоузлов иммунизированного кролика и лимфоцитах человека равно 3—8 час (Ambrose, 1969; Lerner e. a., 1972). В то же время на основании ауторадиографических исследований антителопродуцирующих клеток был сделан вывод об относительной независимости синтеза белков от синтеза РНК и о стабильности мРНК, кодирующей синтез антител в течение времени, необходимого для превращения плазмобласта в зрелую плазматическую клетку, т. е. в течение 24 час, а максимум — в течение месяца (Mitchell, Nossal, 1963; Miller, 1964). Можно думать, что выделение индивидуальных мРНК позволит внести ясность и в эти вопросы.

III.4. ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ мРНК

Возникает вопрос, если под действием мРНК в различных системах, в том числе совершенно посторонних, таких, как ооциты лягушки, ретикулоциты кролика, клетки Кребса, удастся индуцировать синтез полипептидных цепей иммуноглобулинов, то, может быть, аналогичный процесс идет и в лимфоидной ткани. Действительно, «наведение» син-

теза антител и мембранных иммуноглобулинов в нормальных клетках под действием «иммунной» РНК описано рядом авторов (Sterzl, Hroubežová, 1956; Cohen, 1967a; Fishman, Adler, 1967; Bhoopalani e. a., 1972), хотя имеются и данные противоположного характера (Roelants, Goodman, 1969). Тщательная проверка иммуногенных препаратов РНК выявила в них следы антигена (Askonas, Rhodes, 1965; Gottlieb, 1968); кроме того, было показано, что так называемая иммунная РНК существует и в нормальных клетках и имеет молекулярный вес значительно меньший, чем необходимо иммуноглобулиновой мРНК. Однако в свете последних идей о механизме внедрения микронуклеотидных последовательностей в V-гены (Wu, Kabat, 1970), вероятно, можно предположить, что эта низкомолекулярная РНК, легко соединяющаяся с антигеном и резко усиливающая его иммуногенность, и есть «гипервариабельная» мРНК. Следует отметить, что это предположение можно проверить экспериментально, выделив разные иммунные РНК и проанализировав в них последовательности нуклеотидов. Хотя большинству исследователей эти предположения кажутся маловероятными, исключить передачу мРНК от клетки к клетке, по-видимому, нельзя.

Предполагалась также и индукция образования антител с помощью ДНК (Pelc e. a., 1972). Косвенно в пользу передачи информации с помощью коротких отрезков ДНК свидетельствуют недавно появившиеся данные об экскретируемой лимфоидными клетками ДНК (Rogers, 1976).

III.5. СКОЛЬКО ГЕНОВ УЧАСТВУЕТ В СИНТЕЗЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ?

Исследования первичной структуры и генетики иммуноглобулинов привели к выводу о том, что каждая полипептидная цепь кодируется по меньшей мере двумя генами: V-геном, ответственным за вариабельный участок, и С-генами, ответственными за константные участки молекул. Количество тех и других генов в геноме клетки представляет принципиальный интерес. Дело в том, что наблюдаемое разнообразие антител разными авторами объясняется либо с позиции теории «зародышевых» генов, согласно которой в геноме имеется набор генов для всех известных V-областей, т. е. много тысяч V-генов, либо с позиций теории соматических мутаций, согласно которой набор V-генов в геноме ограничен, а разнообразие структуры иммуноглобулинов (антител) возникает в результате соматических мутаций. Существует также компромиссная точка зрения. Все эти представления исчерпывающе обсуждены в статье Лидера и соавторов (Lederg e. a., 1974), поэтому более подробно мы на них останавливаться не будем.

Следует отметить, что А. Е. Гурвичем и Р. С. Незлиным (1965) было выдвинуто оригинальное предположение о том, что отдельные участки генома кодируют и активные центры антител и что H- и L-цепи «собираются» из более мелких, независимо синтезируемых цепочек. Чрезвычайно интересно, что спустя всего пять лет эти идеи возникли вновь в виде гипотезы «внедрения» («insertion») информации, кодируемой небольшими полинуклеотидами (порядка 30—45 нуклеотидов), обеспечивающими наличие гипервариабельных участков в H- и L-цепях (Wu, Kabat, 1970).

Окончательный ответ на поставленные вопросы, очевидно, может дать лишь прямое определение числа V- и С-генов в геноме. Выделение препаратов мРНК с высокой степенью чистоты позволило начать соответствующие опыты. Подход, развиваемый в течение ряда лет, заключается в определении числа генов с помощью РНК—ДНК-гибридизации. Поскольку структура мРНК полностью комплементарна структуре транскрибируемого участка ДНК, то таким способом можно определить число генов и установить, не происходит ли их амплификации (умножения) при индукции синтеза иммуноглобулинов.

В настоящее время исследования такого рода проводятся с мРНК, кодирующими синтез L-цепей, поскольку достаточно чистых препаратов Н-мРНК пока не получено. Существенным условием проведения этих экспериментов является, во-первых, чистота препарата мРНК и его высокая удельная активность и, во-вторых, наличие очень большого избытка ДНК. Получить высокоочищенные препараты мРНК довольно сложно. Обычно для этого используют мРНК, выделенные из клеток, культивируемых в присутствии высоких доз ^3H - или ^{32}P -предшественников (Delovitch, Baglioni, 1973; Rabbits *et al.*, 1974), или чаще — мРНК, меченные ^{125}I *in vitro* (Farace *et al.*, 1976; Matthyssens *et al.*, 1976). Существует также непрямой вариант метода. Он состоит в том, что сначала с помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК получают высокоочищенную комплементарную ДНК (кДНК) и ее уже используют для гибридизации с клеточной ДНК (Schechter *et al.*, 1976; Storb *et al.*, 1976).

Очищенную мРНК или кДНК гибридизуют в определенных условиях с денатурированной (разрушенной ультразвуком) ДНК из печени или из миеломных клеток мыши и определяют процент связавшейся РНК (или кДНК) в зависимости от времени гибридизации. (Определение основано на устойчивости гибридов к действию РНКазы.) При данных условиях процент гибридизовавшейся РНК (кДНК) (f) зависит от концентрации РНК (кДНК) (R_0), концентрации ДНК (C_0) и времени инкубации (t). При очень большом избытке ДНК f не зависит от R_0 , а зависит только от C_0 и t (Cot). Величина Cot , при которой гибридизация достигает 50% ($Cot_{1/2}$), очевидно, зависит от степени комплементарности ДНК и мРНК (кДНК). Частота (F) повторов (реитерации) гена рассчитывается при этом по формуле

$$F = F^* \frac{Cot_{1/2} C}{Cot_{1/2} C^*},$$

где C — исследуемый сложный геном, а C^* — ген, использованный в качестве стандарта, F^* для которого уже известна.

Степень гомологии двух мРНК (а следовательно, их V- или С-генов) определяется либо в опытах по конкурентному угнетению гибридизации меченого препарата мРНК немечеными препаратами гомологичной и гетерологичной мРНК, либо путем выделения ДНК из образовавшегося гибрида и гибридизации ее с другими мечеными гомологичными и гетерологичными мРНК. Сопоставляя полученные результаты с данными о первичной структуре тех полипептидов, которые кодируются исследованными мРНК, можно увидеть, соответствует ли определенная по кривой гибридизации частота повтора генов с предполагаемой на основании данных о гомологии V- и С-областей.

В опытах по гибридизации различных мРНК и ДНК, особенно ранних, как правило, получались двухфазные кривые с одной зоной перехода в области низких и второй — в области высоких значений $Cot_{1/2}$ (Rabbits *et al.*, 1974; Storb, 1974; Tonegawa *et al.*, 1974a).

Использование для угнетения гибридизации немеченых мРНК, кодирующих L-цепи с гомологичными или гетерологичными C-областями, позволило уже тогда установить, что высокие значения $Cot_{1/2}$ обусловлены гибридизацией C-генов и что число этих генов не превышает двух — четырех на гаплоидный геном. Наличие же области с низкими значениями $Cot_{1/2}$ частью исследователей рассматривалось как доказательство наличия значительного числа «зародышевых» V-генов. Однако повышение чистоты препаратов мРНК и использование фрагментов мРНК, содержащих и не содержащих полиА-последовательности, позволило в последние годы установить, что V-гены также являются уникальными и что они представлены в геноме в количестве, не превышающем двух-трех копий (Rabbits, Milstein, 1975; Farace *et al.*, 1976; Matthyssens *et al.*, 1976; Storb, Marvin, 1976).

Рассмотрим в качестве примера данные опытов по гибридизации мРНК, кодирующей синтез ламбда-L-цепи мышинной миеломы МОРС 104Е, с ДНК из печени мыши (Matthyssens *et al.*, 1976). На основании данных о первичной структуре V-областей все исследованные в настоящее время ламбда-цепи мышей (18 образцов) подразделены на семь подгрупп. Если для каждой V-области существует отдельный V-ген, то в геноме мыши должно обнаруживаться 7 V-генов. На самом деле число их может быть не менее 145 (при этом условии вероятность обнаружения семи разных подгрупп при исследовании всего 18 образцов повышается до 90%; при 50%-ной вероятности число V-генов должно быть не меньше 25). Из кривой гибридизации было определено, что V-ген для L-цепи МОРС 104Е повторяется в геноме не более 2—3 раз. В то же время степень гомологии для двух мРНК, кодирующих синтез двух ламбда-цепей, относящихся даже к двум разным подгруппам (МОРС 104Е и НОРС 2020), весьма велика. Экстраполируя полученные данные на остальные мРНК, кодирующие ламбда-цепи, можно заключить, что при таком сходстве V-областей этих цепей L-мРНК МОРС 104Е должна была бы гибридизоваться со всеми ими и, следовательно, значения $Cot_{1/2}$ должны были бы быть значительно ниже определяемых на опыте (чем больше повторов, тем ниже значение $Cot_{1/2}$). Полученные данные говорят, таким образом, против наличия в геноме значительного числа V-генов и, следовательно, в пользу соматических мутаций как основного фактора, обеспечивающего разнообразие антиген (иммуноглобулинов).

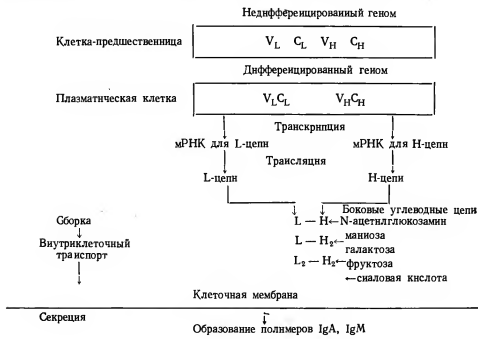
Необходимо, однако, отметить, что метод гибридизации достаточно сложен и, по-видимому, пока не позволяет однозначно трактовать полученные результаты. Так, в отличие от описанных выше опытов, при использовании кДНК для V- и C-областей в отдельности (кДНК_V и кДНК_C) была обнаружена высокая специфичность гибридизации кДНК_V с мРНК (Smith, 1977; Stavnezer, Bishop, 1977). Оказалось, что в то время как кДНК_C в равной степени гибридизуется со всеми мРНК, кодирующими L-цепи каппа-типа, кДНК_V вступает в реакцию только с гомологичной каппа-мРНК. Это свидетельствует о том, что определяемое методом гибридизации количество V-генов может быть занижено.

В то же время метод гибридизации оказался весьма полезным для изучения локализации V- и С-генов в клеточном геноме. Недавно с помощью этого метода удалось продемонстрировать соматическую реорганизацию генов, кодирующих V- и С-участки иммуноглобулинов (Hozumi, Tonegawa, 1976). Было показано, что в эмбриональном геноме мыши V- и С-гены разделены, в то время как в опухолевых (плазмочитомы МОРС 321, НОРС 2020) они расположены рядом (слиты).

Кривые гибридизации мРНК с ДНК, выделенной из клеток печени и миеломы, были почти одинаковы. Это означает, что в клетках, продуцирующих иммуноглобулины, не происходит амплификации кодирующих их генов.

Таким образом, в настоящее время установлено, что в геноме имеется 2 или 3 гена, кодирующих V-области ламбда-цепей, 2 или 3 гена, кодирующих V-области каппа-цепей, и 2—4 гена, кодирующих С-области L-цепей.

Очевидно, последовательность событий при синтезе полипептидных цепей иммуноглобулинов можно в настоящее время представить следующим образом (по Potter, 1972):



Сначала происходит соединение V- и С-генов¹, затем этот участок ДНК плюс еще 200—450 нетранслируемых нуклеотидов транскрибиру-

¹ Возможные механизмы образования сложного VC-гена обсуждены в ряде статей (Gally, Edelman, 1970; Hood, Talmage, 1970; Smithies, 1970; см. также раздел II.6. настоящей книги). Необходимо, однако, подчеркнуть, что данные, полученные при сравнении эмбрионального и опухолевого геномов, несовместимы с моделями объединения V- и С-генов путем образования копий, но не противоречат моделям, предполагающим «вырезание — внедрение», инверсии или делеции (Hozumi, Tonegawa, 1976; Tonegawa *et al.*, 1977).

ются в мРНК, которая после присоединения на 3'-конце 200 полнА-нуклеотидов переносится в цитоплазму и включается в состав полирибосом, где кодирует синтез предшественников полипептидных цепей иммуноглобулинов.

После отщепления от предшественников экстрапептидов (а может быть, и до этого) начинается сборка молекул иммуноглобулинов, перенос их в микросомальные везикулы и либо секреция, либо включение в клеточную мембрану.

III.6. СБОРКА МОЛЕКУЛ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

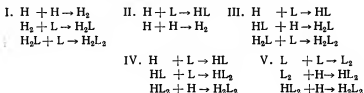
Синтез Н- и L-цепей осуществляется отдельными классами полирибосом, не связанными между собой. Как образуется молекула иммуноглобулина, состоящая из 4—5 (в случае IgG и IgA) или из 21 (в случае IgM) полипептидных цепей и содержащая, кроме того, значительное количество углеводов, и где это происходит?

По этим вопросам существует огромная литература, подробное рассмотрение которой в рамках настоящего обзора невозможно. Мы ограничимся лишь кратким перечислением основных установленных фактов.

Показано, что сборка молекул IgG, IgA и IgM может начинаться в тот момент, когда тяжелые цепи еще не построены до конца и связаны с полирибосомами. В этом случае L-цепи, высвободившиеся из легких полирибосом, подходят к тяжелым полирибосомам и комплементируются с растущими на них Н-цепями. Подтверждением этому служат многочисленные данные об обнаружении L-цепей на тяжелых полирибосомах, полученные в различных лабораториях при изучении механизмов синтеза и сборки молекул иммуноглобулинов как на целых клетках (Shapiro *et al.*, 1966; Askonas, Williamson, 1967b), так и в бесклеточных системах (Vassalli *et al.*, 1971). Было даже высказано предположение, что L-цепи участвуют в снятии Н-цепей с полирибосом, и постулировано, что промежуточными продуктами при сборке молекул иммуноглобулинов должны являться HL-половинки молекул (Shapiro *et al.*, 1966b). В ряде случаев такие димеры действительно были найдены. Иногда это ковалентно связанные полипептидные цепи (Schubert, 1968), а иногда просто ассоциированные за счет нековалентных взаимодействий молекулы (Laskov *et al.*, 1971). В то же время в опытах Вассалли и сотрудников (Vassalli *et al.*, 1971) наблюдалось высвобождение из полирибосом Н-цепей без какой-либо ассоциации их с L-цепями, а в опытах Циммермана и Керна (Zimmerman, Kern, 1972) — секреция не полностью синтезированных Н-цепей из клеток лимфоузла кролика. Это указывает на то, что снятие тяжелых цепей с полирибосом может осуществляться и без участия легких цепей. Однако, по-видимому, L-цепи облегчают этот процесс, способствуя сольюбилизации Н-цепей.

Основная сборка молекул осуществляется в цистернах эндоплазматического ретикула, куда поступают вновь синтезированные Н- и L-цепи. Там они сначала образуют нековалентные комплексы HL, HH, HHL и LHL, которые почти тотчас же превращаются в ковалентные за счет замыкания S—S-связей. Сборка молекул иммуноглобулинов может идти самыми разными путями (Baumal *et al.*, 1971). В настоящее

время описано пять возможных путей сборки:



Исследования промежуточных продуктов при синтезе и секреции иммуноглобулинов клетками различных миелом показали, что возможны и действительно осуществляются все мыслимые комбинации. В ряде случаев в одной и той же клетке наряду с полностью собранными молекулами обнаруживаются и продукты частичной сборки.

В опухолях обычно имеется один основной и несколько минорных путей сборки молекул иммуноглобулинов. Миеломные белки IgG1 и IgG2a собираются главным образом по пути I, а IgG2b — по путям II и III. Характерно, что в среднем распределение различных предшественников в миеломных клетках сходно с таковым в гетерогенной популяции иммунных лимфоидных клеток мыши (Baumal e. a., 1971).

Сборка полимерных молекул (IgA, IgM) идет через стадию накопления в клетках 7S-субъединиц (α_2L_2 , μ_2L_2). Полимеризация 7S-субъединиц в 11—19S-молекулы осуществляется практически одновременно с секрецией их из клетки (Parkhouse, Askonas, 1969; Bevan, 1971b). Существенное влияние на сборку молекул иммуноглобулинов оказывает изменение температуры (Boonhoug, Baumal, 1976).

В молекулы полимерных иммуноглобулинов, помимо H- и L-цепей, входит еще добавочная полипептидная цепь J (см. раздел I.1.1). В IgA, обнаруживаемых в различных секретах организма, имеется, кроме того, так называемый секреторный компонент (S-компонент). Конкретные механизмы синтеза J-цепи и S-компонента изучены недостаточно. Известно, что J-цепи образуются в тех же клетках, которые продуцируют иммуноглобулины (Parkhouse, 1972); одним из мест синтеза S-компонента у человека являются клетки тимуса и эпителиальные клетки, секретирующие муцин, а у свиньи — эпителиальные клетки крипт кишечника (Сидорова, 1974). С α -цепями IgA S-компонент связан S—S-связями. Соединение IgA с S-компонентом, по-видимому, осуществляется в эпителиальных клетках, куда IgA проникает уже после секреции его из плазматических клеток. В полностью собранных молекулах мономерных иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgD) имеется от 3 до 7 межцепочечных S—S-связей (одна-две между тяжелыми и легкими цепями и от одной до пяти между тяжелыми), а в полимерных иммуноглобулинах (IgA, IgM) — от 4 до 25. Замыкание S—S-связей обычно происходит уже после высвобождения цепей из полирибосом и занимает 2—21 мин (Baumal e. a., 1971; Laskov e. a., 1971). Порядок образования ковалентных связей (H—L или H—H) определяется, вероятно, относительной стабильностью этих связей, однако пока нам об этом известно мало.

Помимо S—S-связей, в стабилизации структуры иммуноглобулинов весьма существенную роль играют взаимодействия между определенными аминокислотными остатками H- и L-цепей. Так, например, трехмерная структура Fab-фрагментов патологического иммуноглобулина человека New обеспечивается взаимодействием остатков 35, 37, 42, 43, 86 и

99 V-области L-цепи с остатками 37, 39, 43, 45, 47, 95 и 108 V-области H-цепи (Poljak *et al.*, 1976). Характерно, что эти положения у всех исследованных до сих пор видов животных являются консервативными. О механизме образования нековалентных связей между цепями иммуноглобулинов, кроме самого факта и того, что скорость их образования примерно равна скорости образования ковалентных связей, почти ничего не известно.

Помимо полипептидных цепей, молекулы всех иммуноглобулинов содержат некоторое количество углеводов. Содержание их неодинаково. Наиболее богаты углеводами IgE, IgD и IgM (7,7—12,0%), а наименее богаты IgG (2,9%); в IgA содержится 7,5% углеводов (Незлин, 1972). Углеводные компоненты присоединяются к константным участкам H-цепей; обычно в мю-цепях они присоединяются в нескольких точках, а в гамма-цепях — в одной (Melchers, 1973). Углеводы в основном состоят из гексоз, аминсахаров и сialовой кислоты. У всех классов иммуноглобулинов имеется по меньшей мере один основной олигосахарид, связанный с константным участком тяжелой цепи, и несколько более мелких углеводных единиц. В некоторых случаях (в мнеломных клетках, продуцирующих и секретирующих только легкие цепи) углеводы обнаруживаются и в легких цепях (Choi *et al.*, 1971). В иммуноглобулинах людей некоторые из этих углеводных компонентов играют роль Gm-факторов.

Присоединение углеводных компонентов к иммуноглобулинам осуществляется на разных этапах сборки молекулы. Например, глюкозамин и манноза могут присоединяться к H-цепям, как еще не сошедшим с полирибосом, так и на более поздних этапах (Sherr, Uhr, 1970). Однако основное присоединение различных олигосахаридов к молекуле иммуноглобулина, несомненно, происходит уже после высвобождения цепей из полирибосом и даже после их выхода из микросомальных везикул в клеточный сок, а некоторые сахара (галактоза, фукоза, сialовые кислоты) включаются в иммуноглобулины лишь на заключительных этапах секреции их из клеток (Melchers, 1973).

III.7. СЕКРЕЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Многочисленными исследованиями, проведенными главным образом на мнеломных клетках (Baumal *et al.*, 1971; Vixbaum *et al.*, 1971), было установлено, что секретировавшиеся могут как целые молекулы иммуноглобулинов, так и различные промежуточные продукты сборки: HL-, H₂-, L-субъединицы и т. д.

Кинетика синтеза и секреции для IgM, IgA, IgG1, IgG2a и капсацей очень сходна. Одна плазматическая клетка секретирует 50—700 молекул иммуноглобулинов в 1 сек (Melchers, 1973; Ghata *et al.*, 1974). Как же осуществляется этот процесс?

Опытами по фракционированию клеток мнелом было показано, что раньше всего вновь синтезированные цепи (метка ³H-аминокислотами) обнаруживаются во фракции полирибосом, связанных с шероховатыми мембранами. Затем меченые иммуноглобулины переходят в гладкие мембраны, т. е. в аппарат Гольджи, и, наконец, секретируются во внеклеточную среду (Melchers, 1973). Скорость переноса молекул от шероховатых мембран к гладким выше, чем скорость переноса их из гладких



Рис. 25. Субклеточное распределение и внутриклеточный транспорт легких цепей иммуноглобулинов, содержащих углеводный компонент (Choi e. a., 1971)

ГлN — глюкозамин; Ман — манноза; Гал — галактоза; Фук — фукоза; а — полипептидная цепь; б — углеводный компонент цепи

мембран во внеклеточную среду. Сопоставляя время появления меченых аминокислотами иммуноглобулинов во внеклеточной среде (через 20—30 мин) со скоростями их синтеза на полирибосомах (~2 мин) и высвобождения в микросомальные везикулы (~2 мин) и из везикул (5 мин), легко подсчитать, что на перенос иммуноглобулинов через гладкие мембраны и клеточную оболочку уходит от 10 до 20 мин. Что же происходит за это время с транспортируемыми иммуноглобулинами?

Одним из наиболее изученных процессов является присоединение к молекуле различных олигосахаридов. Включение сахаров носит ступенчатый характер. Раньше всего присоединяются глюкозамин и манноза, а позже всего — галактоза и фукоза. Предполагается, что присоединение глюкозамина и маннозы способствует конформационным изменениям тяжелых цепей, облегчающим замыкание S—S-связей, и что поэтому оно характерно для ранних этапов сборки. Кроме того, не исключено, что присоединение глюкозамина необходимо для инициации транспорта иммуноглобулинов и что именно оно и определяет, будет молекула секретироваться или нет (Melchers, 1973). Данные о последовательности присоединения различных углеводных остатков к молекулам легких цепей, секретируемых клетками миеломы МОРС 46, схематически изображены на рис. 25. Можно думать, что в принципе так же обстоит дело и с присоединением углеводов к Н-цепи.

У разных животных процессы гликозилирования иммуноглобулинов идут неодинаково.

Какова же роль углеводного компонента в молекулах иммуноглобулинов? Возможно, что наличие углеводов в молекуле существенно для связи ее с мембранами клеточного ретикулума и секрети из клетки. Причина этого пока не выяснена. С другой стороны, считать, что отсутствие секреции иммуноглобулинов из клеток при некоторых патологиях связано с отсутствием в иммуноглобулинах углеводного компонента, по-видимому, неверно. Так, описаны случаи (Sherr, Uhr, 1971a), при которых иммуноглобулин содержит и галактозу, и фукозу, но тем не менее

не секретируется. Не секретируются содержащие углеводный компонент, но не связанные с L-цепями H-цепи и, наоборот, легко секретируются миеломные L-цепи, лишенные углеводных компонентов, и IgG1 с «недоделанным» углеводным компонентом (Melchers, 1973). Очевидно, сахара не являются все же строго необходимыми для транспортировки и секретиции иммуноглобулинов.

До недавнего времени углеводному компоненту иммуноглобулинов уделялось меньше внимания, чем белковому. Не исключено, однако, что углеводы играют весьма существенную роль не только в конформации молекул иммуноглобулинов или транспортировке их из клеток, но и в биологической активности этих молекул, поэтому изучение этого вопроса является чрезвычайно важным.

III.8. МЕМБРАННЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

Все рассмотренные нами до сих пор механизмы и процессы относились к секретируемым иммуноглобулинам. На самом деле имеется два основных типа иммуноглобулинов: секретируемые и мембранные. Последние изучены значительно хуже, что объясняется, во-первых, их меньшим содержанием и, во-вторых, трудностями выделения их в чистом виде. Клеточная мембрана составляет 2—5% массы клеток, а иммуноглобулиновые рецепторы — не более 5% всех мембранных белков, т. е. $\sim 10^{-13}$ г на клетку (Marchalonis e. a., 1973). В основном мембранные иммуноглобулины выявляются на В-клетках, не секретирующих значительных количеств антител (иммуноглобулинов). На поверхности нормальных плазматических клеток иммуноглобулинов обычно нет, хотя известны плазмоцитомы, содержащие мембранные иммуноглобулины, несмотря на высокий уровень секреции миеломного белка (Hiramoto, Ghata, 1973). Обнаружены поверхностные иммуноглобулины и на части секретирующих антитела плазматических клеток (Bankert e. a., 1976). Обычно мембранные иммуноглобулины обладают той же специфичностью, авидностью, аллотипом и идиотипом и так же меняют класс в ходе иммунного ответа, как и секретируемые антитела. В связи с этим им отводится роль специфических рецепторов, через взаимодействие с которыми и осуществляется вовлечение (triggering) клетки антигеном в процессы биосинтеза антител (Сидорова, 1977).

Основным классом поверхностных иммуноглобулинов является 7S IgM с молекулярным весом 180 000 (Uhr, Vitetta, 1973; Askonas, 1975). Кроме того, у мышей и людей обнаружены поверхностные IgD (Melcher e. a., 1974; Fu e. a., 1974) и незначительное количество IgG, а у крыс и мышей — IgA (Baur e. a., 1972; Ramasamy, 1976). IgD обычно присутствует на поверхности вместе с IgM; таким образом, на одной клетке одновременно выявляется два класса иммуноглобулинов. Вопрос этот мало изучен, но, по-видимому, IgD и IgM в ряде случаев обладают одинаковой идиотипической и антительной специфичностями (Fu e. a., 1974; Marchalonis, 1976).

Как известно, синтез иммуноглобулинов в организме появляется лишь на определенной стадии развития животного. При этом в первую очередь начинают работать механизмы, обуславливающие синтез пептидных цепей IgM, и лишь позднее возникает способность к образованию иммуноглобулинов других классов. По сути дела это означает, что

раньше всего «разрешается» работа участков генома, ответственных за синтез цепей V_H и V_L и C_H и C_L и образование соответствующих мРНК. Возможно, это находится в какой-то связи с тем, что поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы представляют собой 7S мономеры IgM, т. е. клетки в первую очередь стремятся обеспечить себя распознающими структурами и лишь затем превращаются в секретирующие гуморальные иммуноглобулины.

В мембране покоящихся лимфоцитов иммуноглобулиновые рецепторы представляют собой относительно устойчивые компоненты. Период полураспада мембранных иммуноглобулинов составляет 10—40 час (Ramasu, 1976), в то время как период полураспада секретируемых мнеломных иммуноглобулинов равен 2—4 час (Askonas, 1975). Различны, по-видимому, и пути высвобождения мембранных и секретируемых иммуноглобулинов из клеток (Vitetta e. a., 1974). Известно, что обменивающийся иммуноглобулин «сходит» с мембраны в комплексе с какими-то еще компонентами (Baur e. a., 1972); молекулярный вес комплексов составляет ~200 000.

Первичная структура мембранных иммуноглобулинов пока не установлена, и механизмы их синтеза не выяснены. С одной стороны, сходство мембранных иммуноглобулинов с секретируемыми позволяет думать, что это одни и те же белки, «судьба» которых определяется уже после их образования, например в процессе их транспортировки. Так, есть данные о том, что рецепторные иммуноглобулины лишены как галактозы и фукозы, так и терминального остатка сialовой кислоты. Можно предположить, что «выбор» между превращением в мембранный, или секретируемый, иммуноглобулин осуществляется на стадии присоединения сахаров, однако данные о секретируемых L-цепях, не содержащих углеводов и IgG, незавершенных по углеводному компоненту, свидетельствуют против этого предположения.

С другой стороны, известно, что цитоплазматические белки, как правило, не гликолизуются, а секретируемые, напротив, всегда почти содержат углеводный компонент. Это позволяет считать, что решение о том, будет белок секретироваться или нет, генетически детерминировано и что информация об этом заложена не в структуре белка, а в структуре мРНК, позволяющей ей «выбрать» тот или иной класс полирибосом (свободные или связанные). Основная роль в процессе отводится мРНК, кодирующей H-цепи. Постулируется, что, пока эта мРНК соединена со свободными полирибосомами, синтезируются только мембранные иммуноглобулины. После индукции антигеном (или митогенами) происходит «переключение» мРНК со свободных полирибосом на связанные с мембранами и синтезированные этими полирибосомами цепи уже принадлежат секретируемым белкам (Bretscher, 1973). Таким образом, мембранные иммуноглобулины рассматриваются не как «недоделанные» или не секретировавшиеся по каким-то причинам, а как особый класс белков, имеющий собственные пути биосинтеза, отличные от таковых для секретируемых иммуноглобулинов. В пользу высказанной гипотезы свидетельствуют данные о различных свойствах мРНК, кодирующих синтез секретируемых и мембранных иммуноглобулинов. Так, было показано, что мРНК для мембранных иммуноглобулинов является значительно более долгоживущей, чем для секретируемых и всех прочих клеточных мРНК (Lerner e. a., 1972).

Существует и еще одно предположение о происхождении поверхностных иммуноглобулинов; оно сводится к тому, что в клетках синтезируется некий прорецептор, представляющий собой компонент мембраны, реагирующий с тем или иным иммуноглобулином, образовавшимся обычным способом в микросомальных везикулах.

III.9. О ВОЗМОЖНОСТИ ОДНОВРЕМЕННОГО СИНТЕЗА РАЗНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ОДНОЙ КЛЕТКЕ

Обнаружение в одной клетке поверхностных, а в ряде случаев и внутриклеточных иммуноглобулинов, принадлежащих к двум разным классам (Ferragini e. a., 1976) или несущих разные аллотипы (Wolf e. a., 1976), ставит новые вопросы и в отношении молекулярных механизмов, обеспечивающих одновременный синтез этих белков. Если раньше считалось, что одна клетка способна продуцировать лишь один класс иммуноглобулинов и в крайнем случае допускалась возможность переключения синтеза, например, с IgM на IgG в процессе клеточной дифференцировки, то в последние годы стало совершенно очевидно, что в одной клетке достаточно часто одновременно синтезируются иммуноглобулины разных классов. Это показано как для нормальных лимфоидных клеток, синтезирующих одновременно IgM и IgG или IgA, или IgM и IgD, так и для миеломных клеток (см. Сидорова, 1977). Каков же механизм одновременного образования двух разных иммуноглобулинов одной клеткой? В качестве одной из альтернатив можно предположить следующую.

В клетках гетерозиготного организма имеются материнские и отцовские гены, ответственные за синтез иммуноглобулинов, и, кроме того, в каждом гаплотипном наборе имеются как V-, так и С-гены. При одновременном запуске гомологичных участков обеих родительских хромосом в принципе может образоваться по меньшей мере два типа иммуноглобулинов, различающихся как по своим V-, так и С-областям; одновременный запуск разных V-генов, локализованных в хромосоме одного из партнеров, приведет к появлению молекул, возможно принадлежащих к одному и тому же классу иммуноглобулинов, но обладающих разными специфичностями, и, наконец, при одновременном запуске нескольких V- и С-генов образуется набор молекул иммуноглобулинов, различающихся по всем параметрам.

Подробное рассмотрение этих вопросов проведено нами ранее (Сидорова, 1977). Здесь мы попробуем перевести имеющиеся данные с «белкового» языка на «нуклеиновый» и разобраться, что же это может означать на молекулярном уровне (не затрагивая вопроса о механизме аллельного исключения). Очевидно, это означает, во-первых, что в клетках одновременно синтезируются два вида мРНК, причем весьма вероятно, что при этом транскрибируется один и тот же V-ген, но разные С-гены, но, может быть, и разные V- и С-гены (Sledge e. a., 1976; Goding, Layton, 1976). Во-вторых, это означает, что и та и другая мРНК либо находят для себя разные рибосомы, либо работает попеременно с одними и тем же набором. Весьма вероятно, что они конкурируют между собой, и не только за рибосомы, но и за L-цепи, сахара, пути транспорта и т. д.

Альтернативное предположение заключается в том, что одна из этих мРНК намного стабильнее другой и что на самом деле на уровне гено-

ма переключение V-гена с одного С-гена на другой уже произошло, но фенотипически все выглядит так, как будто идет одновременное образование двух мРНК и двух белков.

Сама постановка этих вопросов стала возможной только в последние годы. Разрешение их, по-видимому, является лишь вопросом времени.

Литература

- Васильченко В. Н., Дьяченко А. Г., Васильева Е. С., Тодоров И. Н. Исследование полсом селезенки иммунизированных животных. — *Биохимия*, 1969, 34, с. 170—176.
- Горюнова Л. Е., Гречко В. В., Дунаевская Л. Д., Сахарова Н. К. Рибонуклеопротенды цитоплазмы клеток селезенки кролика. — *Биохимия*, 1974, 39, с. 778—786.
- Горюнова Л. Е., Сахарова Н. К., Гречко В. В. Рибонуклеопротенды, содержащие мРНК, в цитоплазме клеток плазматомы мышей. — *Мол. биол.*, 1975, 9, с. 922—933.
- Гурвич А. Е., Незлин Р. С. ДНК и биосинтез антигенов и гамма-глобулинов. — *Усп. соврем. биол.*, 1965, 7, с. 150—175.
- Любимова Е. В., Черновская Т. В., Сидорова Е. В., Лерман М. И. Время жизни мРНК для сычужного альбумина. — *Докл. АН СССР*, 1975, 7, с. 225—228.
- Незлин Р. С. Строение и биосинтез антигенов, «Наука», 1972.
- Незлин Р. С., Кульпина Л. М. Включение аминокислот в белки микросомальной селезенки и лимфоузлов кролика. — *Биохимия*, 1966, 31, с. 316—322.
- Николаева А. И. Выделение полирибосом из селезенки нормального кролика и морских свинок в препаративных количествах. — *Биохимия*, 1976, 41, с. 1753—1759.
- Сидорова Е. В. Механизмы синтеза и секрета иммуноглобулинов. Роль различных субклеточных фракций. — *Усп. соврем. биол.*, 1974, 78, с. 234—253.
- Сидорова Е. В. Природа и возможные механизмы образования антигензависимых неспецифических иммуноглобулинов. — *Усп. соврем. биол.*, 1977, 84, с. 410—428.
- Сидорова Е. В., Абакумова О. Ю., Скорцов В. Т., Лерман М. И. Использование метода специфической иммуносорбции для выделения индивидуальных полирибосом. — *Мол. биол.*, 1973, 7, с. 533—540.
- Скорцов В. Т., Гурвич А. Е. Синтез субъединиц молекул иммуноглобулинов *in vitro*. — *Мол. биол.*, 1968, 2, с. 53—58.
- Учитель Н. Я., Хасман Э. Л. Исследование включения ^{14}C -лейцина в микросомальные фракции печени и селезенки кроликов после введения антигена. — *Биохимия*, 1967, 32, с. 13—16.
- Юрин В. Л. Исследование полирибосом селезенки иммунизированных животных. Автореф. канд. дис. М., 1971.
- Abraham K. A., Pryme I. F., Eikhom T. S. Specificity of factors isolated from free polysomes and microsomes in the *in vitro* protein synthesis in plasmacytoma cells. — *Mol. Biol. Repts*, 1974, 1, p. 371—377.
- Ambrose C. T. Regulation of the secondary antibody response *in vitro*. Enhancement by actinomycin D and inhibition by macromolecular product of stimulated lymph node cultures. — *J. Exptl Med.*, 1969, 130, p. 1003—1029.
- Askonas B. A. Immunoglobulin synthesis and its induction in B-lymphoid cells. — *Acta endocrinol.*, 1975, 78, Suppl., p. 117—132.
- Askonas B. A., Rhodes J. M. Immunogenicity of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages. — *Nature*, 1965, 205, p. 470—474.
- Askonas B. A., Williamson A. R. Balanced synthesis of light and heavy chains of immunoglobulin G. — *Nature*, 1967a, 216, p. 264—267.
- Askonas B. A., Williamson A. R. Biosynthesis and assembly of immunoglobulin G. — *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1967b, 32, p. 223—231.
- Bankert R. B., Wolf B., Pressman D. Antigen-specific receptors on antibody-forming cells expressing light and heavy chain determinants. — *Cell Immunol.*, 1976, 27, p. 111—120.
- Barstad P., Farnsworth V., Weigert M. e. a. Mouse immunoglobulin heavy chains are coded by multiple germ line variable region genes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, 71, p. 4096—4100.
- Baumal R., Potter M., Scharff M. D. Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. — *J. Exptl Med.*, 1971, 134, p. 1316—1334.
- Baumal R., Scharff D. Synthesis, assembly and secretion of γ -globulin by mouse myeloma cells. V. Balanced and unbalanced synthesis of heavy and light chains by IgG-producing tumours and cell lines. — *J. Immunol.*, 1973, 111, p. 448—456.

- Baumal R., Scharff M. D. Immunoglobulin biosynthesis by the MOPC 173 mouse myeloma tumour and a variant spleen clone.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 65—74.
- Baur S., Schenkein I., Uhr J. W. Cell surface immunoglobulin. I. Isolation and characterization of immunoglobulin from murine myeloma cells.—*J. Immunol.*, 1972, 108, p. 748—754.
- Becker M. J., Ralph P., Rich A. A study of lymph node polysomes and proteins during antibody production.—*Biochim. biophys. acta*, 1970, 199, p. 224—235.
- Becker M., Rich A. Polyribosomes of tissues producing antibodies.—*Nature*, 1966, 212, p. 142—146.
- Bernardini A., Tonegawa S. Purification, translation and characterization of immunoglobulin mRNA from plasmacytomas.—*Annual Rep. Basel Inst. Immunol.*, 1973, p. 19.
- Bernardini A., Tonegawa S. Hybridization studies with an antibody heavy chain mRNA.—*FEBS Letters*, 1974, 41, p. 73—77.
- Bevan M. The vectorial release of nascent immunoglobulin peptides.—*Biochem. J.*, 1971a, 122, p. 5—11.
- Bevan M. J. Interchain disulfide bond formation studies on two mouse myeloma, which secrete immunoglobulin A.—*Europ. J. Immunol.*, 1971b, 1, p. 133—138.
- Bhoopalam N., Yakulis V., Costea N., Heller P. Surface immunoglobulins of circulating lymphocytes in mouse plasmacytoma. II. The influence of plasmacytoma RNA on surface immunoglobulins of lymphocytes.—*Blood*, 1972, 39, p. 465—471.
- Boothour R., Baumal R. Effect of reduced temperature on cellular processing and secretion of immunoglobulin (Ig) by mouse myeloma cells.—*Exptl Cell Res.*, 1976, 101, p. 383—395.
- Bretscher M. S. Membrane structure: some general principles.—*Science*, 1973, 181, p. 622—629.
- Brownlee G. G., Cartwright E. M., Cowan N. J. e. a. Purification and sequence of messenger RNA for immunoglobulin light chains.—*Nature New Biol.*, 1973, 244, p. 236—240.
- Burstein Y., Kantor F., Schechter I. Partial amino-acid sequence of the precursor of an immunoglobulin light chain containing NH_2 -terminal pyroglutamic acid.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 73, p. 2604—2608.
- Burstein Y., Schechter I. Amino acid-sequence variability at the N-terminal extra piece of mouse immunoglobulin light-chain precursors of the same and different subgroups.—*Biochem. J.*, 1976, 157, p. 145—151.
- Buxbaum J., Zolla S., Scharff M. D., Franklin E. C. Synthesis and assembly of immunoglobulins by malignant human plasmacytes and lymphocytes. II. Heterogeneity of assembly in cells producing IgM proteins.—*J. Exptl Med.*, 1971, 133, p. 1118—1130.
- Campbell P. N. The function of polyribosomes attached to membranes in animal cells.—*Biochem. J.*, 1970, 117, p. 57P—58P.
- Choi Y., Knopf P., Lennox E. S. Intracellular transport and secretion of an immunoglobulin light chain.—*Biochemistry*, 1971, 10, p. 668—679.
- Cohen E. P. Conversion of non-immune cells into antibody-forming cells by RNA.—*Nature*, 1967a, 213, p. 462—465.
- Cohen E. P. The appearance of new species of RNA in the mouse spleen after immunization as detected by molecular hybridization.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1967b, 57, p. 673—680.
- Cory S., Genin C., Adams J. M. Modified nucleosides and 5'-end groups in purified mouse immunoglobulin light chain mRNA and rabbit globin mRNA detected by borohydride labelling.—*Biochim. biophys. acta*, 1976, 454, p. 248—262.
- Cowan N. J., Milstein C. Stability of cytoplasmic RNA in mouse myeloma. Estimation of the half-life of the mRNA coding for immunoglobulin light chain.—*J. Mol. Biol.*, 1974, 82, p. 469—481.
- Cowan N. J., Secher D. S., Milstein C. Purification and sequence analysis of the mRNA coding for an immunoglobulin heavy chain.—*Europ. J. Biochem.*, 1976, 61, p. 355—368.
- Dammacco F., Franklin E. C., Frangione B. An unusual papain fragment containing the V_H region of an IgG3 myeloma protein.—*J. Immunol.*, 1972, 109, p. 565—569.
- Davis B. K., Delovitch T. L., Sehon A. J. Isolation of polysomes from mouse plasmacytomas.—*Nature*, 1969, 222, p. 172—174.
- Delovitch T. L., Bglioni C. Estimation of light-chain gene reiteration of mouse immunoglobulin by DNA-RNA hybridization.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, 70, p. 173—178.
- Delovitch T. L., Davis B. K., Holme G., Sehon A. H. Isolation of messenger-like RNA from immunochemically separated polyribosomes.—*J. Mol. Biol.*, 1972, 69, p. 373—386.
- Farace M. G., Aellen M. F., Briand P. A. e. a. No detectable reiteration of genes coding for mouse MOPC 41 immunoglobulin light-chain mRNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 727—731.

- Faust C. H., Diggelmann H., Mach B. Estimation of the number of genes coding for the constant part of the mouse immunoglobulin Kappa light chain.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1974, 71, p. 2491—2495.
- Ferrarini M., Viale G., Rizzo A., Pernis B. A study of the immunoglobulin classes present on the membrane and in the cytoplasm of human tonsil plasma cells.—Europ. J. Immunol., 1976, 6, p. 562—565.
- Fishman M., Adler F. L. The role of macrophage-RNA in the immune response.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1967, 32, p. 343—357.
- Fleischman J. B. Synthesis of the rabbit IgG heavy chain.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1967, 32, p. 233—234.
- Frangione B. A new immunoglobulin variant: $\gamma 3$ heavy chain disease protein CH1.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, 73, p. 1552—1555.
- Fraser K. J., Poulsen K., Haber E. Specific cleavage between variable and constant domains of rabbit antibody light chains by dilute acid hydrolysis.—Biochemistry, 1972, 11, p. 4974—4977.
- Fu S. M., Winchester R. J., Feiszi T. e. a. Idiotypic specificity of surface immunoglobulin and the maturation of leukemic bone-marrow-derived lymphocytes.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1974, 71, p. 4487—4490.
- Gally J. A., Edelman G. M. Somatic translocation of antibody genes.—Nature, 1970, 227, p. 341—348.
- Ghata V. K., McGhee J. R., Hamlin M., Hiramoto R. N. Measurement of antibody release from single cells. III. Rate of release of IgM from MOPC 104E plasmacytoma.—J. Immunol., 1974, 112, p. 266—270.
- Goding J. W., Layton J. E. Antigen-induced co-capping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells.—J. Exptl Med., 1976, 144, p. 852—857.
- Gottlieb A. A. The antigen-RNA complex of macrophages.—In: Nucleic acids in immunology Berlin—Heidelberg—New York, Springer Verlag, 1968, p. 471—486.
- Hannestad K., Sletten K. Multiple M-components in a single individual. III. Heterogeneity of M-components in two macroglobulinemia sera with antipolysaccharide activity.—J. Biol. Chem., 1971, 246, p. 6982—6990.
- Hausman S., Bosma M. J. Alteration of immunoglobulin phenotype in cell culture-adapted lines of two mouse plasmacytomas.—J. Exptl Med., 1975, 142, p. 998—1010.
- Hiramoto R. N., Ghata V. K. Studies of MOPC 104E plasmacytoma cells forming rosettes with autologous and syngeneic erythrocytes.—J. Immunol., 1973, 111, p. 893—899.
- Hood L., Talmage D. Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability.—Science, 1970, 168, p. 325—334.
- Hozumi N., Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, 73, p. 3628—3632.
- Kimmel C. B. On the RNA in cultured myeloma cells producing immunoglobulin.—Biochim. biophys. acta, 1969, 182, p. 361—374.
- Knopf P. M., Parkhouse R. M. E., Lennox E. S. Biosynthetic units of an immunoglobulin heavy chain.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1967, 58, p. 2288—2295.
- Laskov R., Lanzerotti R., Schaff M. D. Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. II. Assembly of IgG_{2b} immunoglobulin by MPC 11 tumour and culture cells.—J. Mol. Biol., 1971, 56, p. 327—339.
- Laskov R., Mittelman S. Immune precipitation of immunoglobulin producing polysomes from mouse myeloma cells.—J. Immunol., 1975, 114, pt 1, p. 566—570.
- Leder P., Honjo T., Packman S. e. a. The organization and diversity of immunoglobulin genes.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1974, 71, p. 5109—5114.
- Lerner R. A., McConahey P. J., Jansen I., Dixon F. J. Synthesis of plasma membrane-associated and secretory immunoglobulin in diploid lymphocytes.—J. Exptl Med., 1972, 135, p. 136—149.
- Mach B., Faust C., Vassalli P. Purification of 14S messenger RNA of immunoglobulin light chain that codes for a possible light-chain precursor.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, 70, p. 451—455.
- Mach B., Vassalli P. Biosynthesis of RNA in antibody-producing tissues.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1965, 54, p. 975—982.
- Marchalonis J. J. Isolated, radioiodinated surface immunoglobulins of murine bone-marrow derived lymphocytes which bind the 2,4-dinitrophenyl hapten.—Immunochemistry, 1976, 13, p. 667—670.
- Marchalonis J. J., Cone R. E., Atwell J. L., Rolley R. T. Structure and function of lymphocyte surface immunoglobulin.—In: The biochemistry of gene expression in higher organisms. J. P. Pollack, J. W. Lee (Eds). Dordrecht—Boston, D. Reidel Publ. Co., 1973, p. 629—647.
- Margulies D. H., Cieplinski W., Dharmgri-gartama B. e. a. Regulation of immunoglobulin expression in myeloma cells.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1977, 51, p. 781—791.

- Matthysens G., Hozumi N., Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity.— *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127C, p. 439—448.
- Melcher U., Vitetta E. S., McWilliams M. e. a. Cell surface immunoglobulin. X. Identification of an IgD-like molecule on the surface of murine splenocytes.— *J. Exptl Med.*, 1974, 140, p. 1427—1431.
- Melchers F. Synthesis, transport and secretion of immunoglobulins in lymphoid cells.— In: *The biochemistry of gene expression in higher organisms*. Y. K. Polak and J. W. Lee (Eds). D. Dordrecht—Boston, Reidel Publ. Co, 1973, p. 542—554.
- Miller J. J. An autoradiographic study of the stability of plasma cell ribonucleic acids in rats.— *J. Immunol.*, 1964, 93, p. 250.
- Milstein C., Adetugbo K., Cowan N. J. e. a. Somatic cell genetics of antibody-secreting cells: studies of clonal diversification and analysis by cell fusion.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1977, 51, p. 793—803.
- Milstein C., Brownlee G. G., Cartwright E. M. e. a. Sequence analysis of immunoglobulin light chain messenger RNA.— *Nature*, 1974, 252, p. 354—359.
- Milstein C., Brownlee G. G., Harrison T. M., Mathews M. B. A possible precursor of immunoglobulin light chains.— *Nature New Biol.*, 1972, 239, p. 117—120.
- Mitchell J., Nossal G. J. V. Ribonucleic acid metabolism in the plasma cell sequence.— *Nature*, 1963, 197, p. 1121—1122.
- Moav N., Goldblatt D., Moav B., Frensdorff A. Hybridization kinetics of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid from antigen-stimulated mouse spleen cells.— *J. Immunol.*, 1976, 117, p. 343—349.
- Moav B., Harris T. N. Biosynthetic events in rabbit regional lymph nodes following antigenic stimulation.— *J. Immunol.*, 1970, 104, p. 950—956.
- Moav N., Smolinsky S., Moav B., Frensdorff A. Studies on early events in the differentiation of antibody-producing cells. I. Patterns of deoxyribonucleic acid replication in antigen-stimulated mouse spleen cells.— *J. Immunol.*, 1973, 111, p. 1183—1193.
- Namba Y., Hanaoka M. Immunoglobulin synthesis by cultured mouse myeloma cells.— *J. Immunol.*, 1969, 102, p. 1486—1494.
- Neyer J., Bussard A. E. Kinetics of antibody production by single cells. II. The action of transcription and translation inhibitors upon the metabolism of haemolysin-secreting cells.— *Immunology*, 1972, 22, p. 943—958.
- Nezlin R. S., Kulpina L. M. [Незлин Р. С., Кульпина Л. М.]. Incorporation of radioactive amino acids into γ -globulin in a cell-free system from rat spleen.— *Biochim. biophys. acta*, 1967, 138, p. 654—656.
- Parkhouse R. M. E. Biosynthesis of J-chain in mouse IgA and IgM.— *Nature New Biol.*, 1972, 236, p. 9—11.
- Parkhouse R. M. E., Askonas B. A. Immunoglobulin M biosynthesis. Intracellular accumulation of 7S subunits.— *Biochem. J.*, 1969, 115, p. 163—169.
- Pelc S. R., Harris G., Caldwell I. The relationship between antibody formation and deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis in mouse spleen during primary and secondary response to sheep erythrocytes (SRC).— *Immunology*, 1972, 23, p. 183—197.
- Poljak R. J., Amzel L. M., Phizackerley R. P. Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins.— *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1976, 31, p. 67—93.
- Potter M. Immunoglobulin-producing tumours and myeloma proteins of mice.— *Physiol. Rev.*, 1972, 52, p. 631—719.
- Proudfoot N. J., Brownlee G. G. Sequence of the 3' end of globin mRNA shows homology with immunoglobulin light chain mRNA.— *Nature*, 1974, 252, p. 359—364.
- Pryme I. F., Garatun-Tjeldstø O., Birckbichler P. J. e. a. Synthesis of immunoglobulins by membrane-bound polysomes and free polysomes from plasmacytoma cells.— *Europ. J. Biochem.*, 1973, 33, p. 374—378.
- Rabbits T. H., Bishop J. O., Milstein C., Brownlee G. G. Comparative hybridization studies with an immunoglobulin light chain mRNA fraction and non-immunoglobulin mRNA of mouse.— *FEBS Letters*, 1974, 40, p. 157—160.
- Rabbits T. H., Milstein C. Mouse immunoglobulin genes: studies on the reiteration frequency of light-chain genes by hybridization procedures.— *Europ. J. Biochem.*, 1975, 52, p. 125—133.
- Ramasamy R. Attachment of the antigen receptors to the B cell membrane.— *Immunochimistry*, 1976, 13, p. 705—108.
- Rifkind R. A., Össerman E. F., Hsu K. C., Morgan C. The intracellular distribution of gamma globulin in a mouse plasma cell tumour (X 5563) as revealed by fluorescence and electron microscopy.— *J. Exptl Med.*, 1962, 116, p. 423—432.
- Roelants G. E., Goodman J. W. The chemical nature of macrophage RNA-antigen complexes and their relevance to immune induction.— *J. Exptl Med.*, 1969, 130, p. 557—574.
- Rogers J. C. Identification of an intracellular precursor to DNA excreted by hu-

- man lymphocytes.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, 73, p. 3211—3215.
- Rosenfeld M. G., Abrass J. B., Perking L. A. Cleavage of the polyadenylate-rich region of polyadenylate-rich RNA.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 49, p. 230—238.
- Scharff M. D., Uhr J. W. Functional ribosomal unit of gamma-globulin synthesis.—Science, 1965, 148, p. 646—649.
- Schechter J. Biologically and chemically pure mRNA coding for a mouse immunoglobulin L-chain prepared with the aid of antibodies and immobilized oligothymidine.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, 70, p. 2256—2260.
- Schechter J. Aggregates of partially purified mRNA coding for immunoglobulin light-chain.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974a, 57, p. 857—864.
- Schechter J. Use of antibodies for the isolation of biologically pure messenger ribonucleic acid from fully functional eukariotic cells.—Biochemistry, 1974b, 13, p. 1875—1885.
- Schechter I., Burstein Y. Identification of N-terminal methionine in the precursor of immunoglobulin light chain. Initiation of translation of messenger ribonucleic acid in plants and animals.—Biochem. J., 1976, 153, p. 543—550.
- Schechter I., Burstein Y., Spiegelman S. Structure and function of immunoglobulin genes and immunoglobulin precursors.—Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1976, 127C, p. 421—435.
- Schechter I., Kean D. J., Guver R., Terry W. Partial amino acid sequence of the precursor of immunoglobulin light chain programmed by messenger RNA in vitro.—Science, 1975, 188, p. 160—162.
- Schmeckpeper B. J., Adams J. M., Harris A. W. Detection of a possible precursor of immunoglobulin light chain in MOPC 41A plasmacytoma cells.—FEBS Letters, 1975, 53, p. 96—98.
- Schubert D. Immunoglobulin assembly in a mouse myeloma.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1968, 60, p. 683—690.
- Schubert D., Cohn M. Immunoglobulin biosynthesis. V. Light chain assembly.—J. Mol. Biol., 1970, 53, p. 305—320.
- Shapiro A. R., Scharff M. D., Maizel J. V. Polyribosomal synthesis and assembly of the H and L chains of gamma globulin.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1966a, 56, p. 216—222.
- Shapiro A., Scharff M. D., Maizel J. V., Uhr J. W. Synthesis of excess light chains of gamma globulin by rabbit lymph node cells.—Nature, 1966b, 211, p. 243—245.
- Shapiro D. J., Taylor J. M., McKnight G. S. e. a. Isolation of hen oviduct ovalbumin and rat liver albumin polysomes by in-direct immunoprecipitation.—J. Biol. Chem., 1974, 249, p. 3665—3671.
- Sherr C. J., Uhr J. W. Immunoglobulin synthesis and secretion. V. Incorporation of leucine and glucosamin into immunoglobulin on free and bound polyribosomes.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1970, 66, p. 1183—1189.
- Sherr C. J., Uhr J. W. Immunoglobulin synthesis and secretion. VI. Synthesis and intracellular transport of immunoglobulin in non-secretory lymphoma cells.—J. Exptl Med., 1971a, 133, p. 901—920.
- Sherr C. J., Uhr J. W. Immunoglobulin synthesis on free and bound polyribosomes of rabbit lymph node cells.—J. Immunol., 1971b, 106, p. 69—73.
- Shimotohno K., Kodama Y., Hashimoto J., Miura K.-J. Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1977, 74, p. 2734—2738.
- Shutt R. H., Krueger R. G. The effect of actinomycin D and 5-azacytidine on macromolecular synthesis in murine myeloma tumour cells.—J. Immunol., 1972, 108, p. 819—830.
- Sidorova E. V., Trudolyubova M. G., Lerman M. J. [Сидорова Е. В., Трудовой М. Г., Лерман М. И.]. A general method for isolation of individual polyribosomes and pure mRNA by immunosorption technique.—Mol. Biol. Reports, 1974, 1, p. 401—408.
- Sirisinha S., Eisen H. N. Autoimmune-like antibodies to the ligand binding sites of myeloma proteins.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1971, 68, p. 3130—3135.
- Sledge C., Fair D. S., Black B. e. a. Antibody differentiation: apparent sequence identity between variable region shared by IgA and IgG immunoglobulins.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1976, 73, p. 923—927.
- Smith G. P. The significance of hybridization kinetic experiments for theories of antibody diversity.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1977, 51, 863—875.
- Smith M., Stavnezer J., Huang R. C. e. a. Translation of messenger RNA for mouse immunoglobulin light chains in living frog oocytes.—J. Mol. Biol., 1973, 80, p. 553—557.
- Smithies O. Pathways through networks of branched DNA.—Science, 1970, 169, p. 882—883.
- Solomon A., McLaughlin C. L. Bence-Jones proteins and light chains of immunoglobulins. II. Immunochemical differentiation and classification of Kappa-chains.—J. Exptl Med., 1969, 130, p. 1295—1302.
- Souleil C., Panijel J. DNA replication in

- antigen stimulated guinea-pig lymph node cells.— *Nature*, 1970, 227, p. 456—460.
- Stavnezer J., Bishop J. M. Synthesis and isolation of DNA complementary to nucleotide sequences encoding the variable region of immunoglobulin κ chain.— *Biochemistry*, 1977, 16, p. 4225—4232.
- Stavnezer J., Huang R. C. Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system.— *Nature New Biol.*, 1971, 230, p. 172—176.
- Sterzl J., Hrušešová M. The transfer of antibody formation by means of nucleoprotein fraction to non-immunized recipient.— *Folia microbiol.*, 1956, 2, p. 21—26.
- Storb U. Quantitation of immunoglobulin genes by nucleic acid hybridization with RNA from myeloma and spleen microsomes.— *J. Immunol.*, 1972, 108, p. 755—764.
- Storb U. Turnover of myeloma messenger RNA.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 52, p. 1483—1491.
- Storb U. Evidence for multiple immunoglobulin genes.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 57, p. 31—38.
- Storb U., Hager L., Putnam D. e. a. Sequences related to immunoglobulin Kappa chain messenger RNA in T cell.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 2467—2471.
- Storb U., Marvin S. Analysis of immunoglobulin genes: DNA/RNA hybridization with immunoglobulin k-chain mRNA and isolation and translation of hybridized RNA.— *J. Immunol.*, 1976, 117, p. 259—268.
- Swan D., Aviv H., Leder P. Purification and properties of biologically active messenger RNA for a myeloma light chain.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1972, 69, p. 1967—1971.
- Swenson R. M., Kern M. The synthesis and secretion of γ -globulins by lymph node cells. I. The microsomal compartmentalization of γ -globulins.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1967a, 57, p. 417—422.
- Swenson R., Kern M. Synthesis and secretion of γ -globulin by lymph node cells. II. The intracellular segregation of amino acid-labelled and carbohydrate-labelled γ -globulin.— *J. Biol. Chem.*, 1976b, 242, p. 3242—3244.
- Tonegawa S., Baldi I. Electrophoretically homogeneous myeloma light chain mRNA and its translation in vitro.— *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 51, p. 81—87.
- Tonegawa S., Bernardini A., Weimann B. J., Steinberg C. Reiteration frequency of antibody genes. Studies with κ -chain mRNA.— *FEBS Letters*, 1974a, 40, p. 92—96.
- Tonegawa S., Steinberg C., Dube S., Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974b, 71, p. 4027—4031.
- Tonegawa S., Hozumi N., Matthysens G., Schuller R. Somatic changes in the content of immunoglobulin genes.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1977, 61, p. 877—889.
- Uhr J. W., Viletta E. S. Synthesis, biochemistry and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes.— *Federat. Proc.* 1973, 32, p. 35—40.
- Vassalli P. Studies on cell-free synthesis of rat immunoglobulins. I. A cell-free system for protein synthesis prepared from lymph node microsomal vesicles.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1967, 58, p. 2117—2124.
- Vassalli P., Lisowska-Bernstein B., Lamm M. E. Cell-free synthesis of rat immunoglobulin. III. Analysis of cell-free made chains and of their mode of assembly.— *J. Mol. Biol.*, 1971, 56, p. 1—19.
- Vassalli P., Lisowska-Bernstein B., Lamm M., Benacerraf B. Studies on cell-free synthesis of rat immunoglobulins. II. Synthesis of immunoglobulin and of antibody to the dinitrophenyl hapten.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1967, 58, p. 2422—2429.
- Viletta E., Grundke-Iqbal I., Holmes K., Uhr J. W. Cell surface immunoglobulin. VII. Synthesis, shedding, and secretion of immunoglobulin by lymphoid cells of germ-free mice.— *J. Exptl. Med.*, 1974, 139, p. 862—876.
- Wall R., Lippman S., Toth K., Fedoroff N. A general method for the large-scale isolation of polysomes and messenger RNA applied to MOPC 21 mouse myeloma tumours.— *Analyt. Biochem.*, 1977, 82, p. 115—129.
- Wolf B., Izenberg H., Wang S. S. Rosette plaques with lymphoid cells from heterozygous rabbits. Anti-hapten antibody-forming cells displaying either one or both b locus surface allelic markers.— *Immunology*, 1976, 31, p. 287—301.
- Wu T. T., Kabat E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.— *J. Exptl. Med.*, 1970, 132, p. 211—249.
- Zimmerman D. H., Kern M. Synthesis and secretion of γ -globulin by lymph node cells. X. The generation of incompletely synthesized immunoglobulin heavy chains.— *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 4566—4571.

IV

СТВОЛОВАЯ КРОВЕТВОРНАЯ КЛЕТКА И ЕЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МИЕЛОИДНОМ И ЛИМФОИДНОМ НАПРАВЛЕНИЯХ

Кроветворная и лимфоидная ткани представляют собой клеточную самообновляющуюся систему, новообразование клеток в которой, направленное на пополнение убыли зрелых элементов с ограниченным жизненным циклом, происходит в организме млекопитающих на протяжении всей жизни. Поддержание системы обеспечивается клетками-предшественниками, под которыми понимаются клетки, находящиеся на тех стадиях в гистогенетическом ряду, на которых пролиферирующие клетки могут давать потомство либо таких же, как они сами, клеток, либо клеток, переходящих на следующую стадию дифференцировки.

Клетки-предшественники различаются как по способности к самоподдержанию, так и по дифференцировочным потенциям. Некоторые из них обладают способностью к самообновлению на протяжении срока, превышающего время существования всего организма, другие рассчитаны лишь на несколько митозов. Одни из клеток-предшественников способны к дифференцировке по многим направлениям, другие коммитированы (ограничены в выборе) лишь по одному пути и т. д. Объединяет все категории этих клеток их способность к образованию клеточных клонов. Это их свойство позволило выявить и охарактеризовать основные категории клонообразующих клеток кроветворной-лимфоидной системы, их число, компетенцию к различным дифференцировкам и т. д.

IV.1. СВОЙСТВА СТОЛОВОЙ КРОВЕТВОРНОЙ КЛЕТКИ

Дифференцировка кроветворных клеток носит необратимый характер. Ни в одной из систем не удалось обнаружить возврата клетки из более дифференцированного отдела в предыдущий, менее дифференцированный. Кроветворная система, которая состоит как из пролиферирующих, так и из утративших эту способность клеток, содержит элементы, обеспечивающие поддержание системы в целом. Эти элементы уже давно получили название стволовых клеток. Последние по определению должны обладать по крайней мере двумя основными свойствами: способностью к самоподдержанию, сравнимому с временем существования всего организма, и способностью к дифференцировке в более зрелые клеточные элементы.

IV.1.1. Метод изучения

Длительное время проблема исследования стволовых кроветворных клеток носила умозрительный характер. Экспериментальное ее изучение стало возможным лишь после создания метода клонирования кроветворных клеток в селезенке облученных мышей (Till, McCulloch, 1961).

Костномозговые клетки, введенные смертельно облученным мышам в небольшом количестве, попадают в различные кроветворные органы, и в частности в селезенку. Проплиферация введенных кроветворных клеток в ней приводит к образованию очагов (колоний) кроветворения, дискретно расположенных по всей селезенке и хорошо видимых макроскопически в виде узелков, содержащих через 7—10 дней после трансплантации до нескольких миллионов кроветворных клеток.

В среднем при трансплантации 10^4 клеток сингенного костного мозга образуются одна — три колонии. Отсюда возникает ключевой для любого метода клонирования вопрос, образуется ли колония одной кроветворной клеткой или в ее создании принимает участие популяция клеток, составляющая часть трансплантированной популяции. Показано (Till, McCulloch, 1961), что с увеличением числа трансплантированных клеток линейно возрастает число колоний. Этот факт является серьезным аргументом в пользу клонального происхождения колоний.

Однако только факт наличия линейных отношений между числом вводимых клеток и числом возникающих колоний не является достаточным для доказательства клонального происхождения колоний. Действительно, если в образовании колоний кооперируют два или больше клеточных типа, только один из которых лимитирован во взвеси кроветворных клеток, то и в этом случае будут наблюдаться линейные отношения между числом введенных клеток и числом возникающих колоний.

Клональный характер колоний в селезенке был доказан с помощью метода радиационных маркеров (Becker *et al.*, 1963). С этой целью мышам облучали в дозе 250 рад, трансплантировали им большую дозу сингенного костного мозга, после чего облучали вторично в дозе 650 рад. В этих условиях мыши-реципиенты получали суммарную дозу в 900 рад, которая практически полностью инактивировала их собственные колониобразующие клетки, тогда как трансплантированные клетки получили меньшую дозу облучения (650 рад) и часть из них выжила. При этом велика вероятность того, что облученная в такой дозе клетка хотя и выживает, но несет какую-либо стабильную хромосомную aberrацию (хромосомный маркер), позволяющую идентифицировать ее и ее потомков. Кариологический анализ показал, что в большинстве изученных колоний, в которых обнаруживался хромосомный маркер, одинаковую aberrацию несли все делящиеся клетки данной колонии. Так как независимое возникновение одинаковой aberrации даже только в двух клетках статистически весьма маловероятно, эти факты показывают, что колонии (или по крайней мере большинство их) представляют собой клон потомков одной колониобразующей клетки. Таким образом, колония продуцируется одной исходной клеткой (колониобразующая единица в селезенке — КОЕс). Гистологически колонии бывают нескольких типов: эритроидные, гранулоцитарные, мегакариоцитарные. Лимфоидные колонии в селезенке не образуются (Lewis, Trobaugh, 1964; Mekori, Feldman, 1965). После ретрансплантации клеток колонии новому облученному реципиенту вновь возникают колонии всех типов независимо от того, ретрансплантированы ли клетки эритроидной или гранулоцитарной колонии (Lewis, Trobaugh, 1964).

Таким образом, клетки, продуцирующие колонии, способны к самоподдержанию (в колонии образуются новые КОЕс) и к дифференцировке в более зрелые клетки. Способность к самоподдержанию у КОЕс очень высока, за время существования колонии они проделывают по

25 делений, а при повторных переносах — значительно больше (см. раздел IV.1.3). Таким образом, КОЕс обладают свойствами, обязательными для стволовых клеток. И хотя, видимо, не все стволовые клетки дают колонии в селезенке, приведенные данные позволяют считать доказанным, что КОЕс представляют собой фракцию стволовых кроветворных клеток. Это дает возможность использовать метод клонирования кроветворных клеток в селезенке облученных мышей для анализа свойств стволовых кроветворных клеток.

Здесь своевременно сделать две оговорки. Во-первых, метод позволяет определить количество КОЕс в кроветворной ткани. Легко видеть, что количество КОЕс не совпадает с содержанием во вводимой взвеси всех клеток, способных к образованию колоний (КОКс), прежде всего потому, что в селезенку попадает только часть (*f*) введенных колониеобразующих клеток, тогда как другие попадают в иные отделы кроветворной системы или теряются в неспособных к поддержанию кроветворения участках. Вполне корректного метода определения величины *f* не существует, хотя для установления ее было использовано по меньшей мере пять различных подходов (Siminovitsh e. a., 1965; Matioli e. a., 1968; Lahiri e. a., 1970; Hendry, 1971; Chertkov e. a., 1972).

Однако этими трудностями проблема определения количества КОКс не исчерпывается. Часть имеющихся в трансплантируемой клеточной взвеси КОКс может не дать колоний в селезенке не только потому, что они там не осели, и не потому, что они погибли при приговлении клеточной суспензии (что можно пытаться определить, сравнивая, например, количество КОКс, выявляемых путем экзо- и эндоколонизации), но и в силу того, что репопулирующие КОКс, попав в селезенку или в костный мозг, имеют не 100%-ную вероятность приживления с последующим образованием колоний. Такая ситуация не является невероятной. Для многих клеток (даже интенсивно пролиферирующих) эффективность клонирования *in vitro* и приживления *in vivo* бывает ниже 100%. Если, однако, для тех же клеток вероятность быть использованными в качестве источника кроветворения в случае сохранения на месте (без миграции в кровь и репопуляции) или в случае попадания в другой орган (например, не в селезенку, а в костный мозг) ощутимо выше, чем после поступления в селезенку, то метод определения числа КОКс по числу кроветворных колоний в селезенке должен приниматься с поправкой на эффективность клонирования. Эта величина неизвестна, и ее значение редко обсуждается.

Во-вторых, КОЕс не представляют собой гомогенной клеточной популяции и различаются по всем изученным до настоящего времени параметрам: плотности, размеру, способности к самоподдержанию и, возможно, по вероятности той или иной дифференцировки (см. Чертков, 1976). Объединяют их только два основных свойства — способность к длительному самоподдержанию и дифференцировке. Возможно, различия определяются тем, что КОЕс имеют иерархическую структуру и объединяют несколько стадий дифференцировки исходных стволовых клеток. Следовательно, полученные на основании изучения КОЕс данные могут на самом деле характеризовать не весь отдел стволовых кроветворных клеток, а лишь ту или иную их субпопуляцию.

IV.1.2. Миграция

Стволовые кроветворные клетки содержатся во всех тканях, где происходит кроветворение, например у взрослых млекопитающих — в костном мозге (у мышей также и в селезенке), и в возникающих в тех или иных случаях очагах эктопического кроветворения. В других лимфоидных органах (тимус, лимфатические узлы, пейеровы бляшки) стволовые кроветворные клетки практически отсутствуют (Mekori *et al.*, 1965).

Важной особенностью стволовых клеток является их способность к репопуляции, т. е. к выходу в кровь с последующей миграцией в иные участки кроветворной системы. В связи с этим стволовые клетки легко и постоянно обнаруживаются в крови. Прямым образом миграция стволовых клеток была показана на смешанных химерах, разные участки кроветворных тканей которых были заселены двумя типами клеток, различимых по хромосомному маркеру. При повторном частичном облучении таких химер клеточный состав облученных участков менялся соответственно тому, какие из частей кроветворной системы были экранированы при облучении (Maloney, Patt, 1972). И, хотя сам факт способности кроветворных клеток к репопуляции не вызывает сомнений, вопрос об интенсивности их миграции все еще неясен. Попытки прямого измерения скорости миграции стволовых клеток из экранированных участков в облученные привели к существенным (в десятки раз) расхождениям (Чертков, 1976), хотя в целом все эти исследования говорили о весьма высокой интенсивности обмена стволовых клеток. В последнее время были получены данные о том, что эти результаты, видимо, завышены. При трансплантации костного мозга от двух сингенных подлинных мышей, содержащих и не содержащих хромосомный маркер (Т6Т6), при высокой интенсивности обмена стволовыми клетками и при равной пролиферативной активности клеток обеих подлинных разумно было бы ожидать одинакового соотношения метафаз партнеров во всех кроветворных участках облученного реципиента. Однако это оказалось не так. При введении по 10^6 клеток каждой линии у половины реципиентов соотношение метафаз в правом и левом бедре статистически значимо отклонялось от ожидаемого (50%). Даже при увеличении в 20 раз дозы вводимых клеток у 20% мышей все еще не наблюдалось равного представительства клеток обоих доноров в разных костях (Micklem, *et al.*, 1975a). Следовательно, даже в опустошенную струю костного мозга миграция стволовых клеток не очень интенсивна. При стабильно равновесном кроветворении обмен стволовыми клетками между различными участками кроветворной системы крайне мал. Это отличает кроветворную систему от лимфоидной, в которой клеточные миграции существенно выше и интенсивность замены клеток (например, в лимфатических узлах и еще больше в тимусе) достигает больших величин (Micklem *et al.*, 1975b).

IV.1.3. Самоподдержание

Стволовые кроветворные клетки не представляют собой быстро пролиферирующую популяцию с коротким и относительно постоянным временем генерации. Исследования с ядами, избирательно поражающими делющиеся клетки лишь в определенной стадии клеточного цикла, показа-

ли, что средства, вызывающие гибель клеток, находящихся в периоде редупликации ДНК (например, ³H-тимидин высокой удельной активности, оксимочевина и др.), почти не влияют на стволовые клеточные линии животных со стабильным клеточным делением (Dunn, 1971) и поэтому не снижают защитных способностей клеточных линий, лишенных синтезирующих ДНК клеток (Haas e. a., 1972). Отсюда следует, что при равновесном клеточном делении подавляющее большинство (видимо, не менее 90%) стволовых клеток находится вне клеточного цикла (период G₀) или в длительном периоде G₁. Стабильное поддержание величины отдела стволовых клеток обеспечивается небольшой долей пролиферирующих клеток. В случае угнетения отдела в покоящихся стволовых клетках быстро индуцируется пролиферация. Так, после трансплантации в облученный организм стволовые клетки через 3—4 дня находятся в фазе экспоненциального роста. В это время величина тимидинового «самоубийства» их составляет до 50—60% (Becker e. a., 1965; Чертков и др., 1972). Так как продолжительность S-периода для стволовых клеток составляет в это время до 70% от общей длительности клеточного цикла (Hodgson e. a., 1975), ясно, что в условиях гемопозитического стресса пролиферация может индуцироваться во всей популяции сохранившихся стволовых клеток. В связи с этим время удвоения экспоненциально растущей популяции стволовых клеток оказывается очень коротким, порядка 15—20 час. Возникает вопрос, не исчерпывают ли стволовые клетки в процессе пролиферации способности к самоподдержанию. Иными словами, это вопрос о том, имеют ли стволовые клетки возрастную структуру, равноценны ли по способности к дальнейшей пролиферации стволовые клетки, проработавшие на протяжении своей предыдущей истории различное число митотических делений.

Систематическое изучение способности к самоподдержанию стволовых клеток от животных разного возраста было осуществлено (Metcalf, Moore, 1971) с помощью метода селезеночных колоний. Не было выявлено различий в содержании КОЕс на колонии при серийных пассажах клеток колоний, продуцированных костным мозгом молодых животных (восемь недель) по сравнению с костным мозгом старых мышей (1,5—2,5 года); истощение в обоих случаях наступало через три пассажа. КОЕс из печени новорожденной мыши выдерживали четыре пассажа, из печени 10-дневных эмбрионов — шесть пассажей, из желточного мешка 9-дневных эмбрионов — семь пассажей. Очень приблизительные расчеты (время генерации КОЕс в колонии принято 12 час во все время пассажей) показали, что КОЕс взрослых животных может делиться 28 раз до выявления дефекта в пролиферации, КОЕс новорожденных — 56 раз и КОЕс ранних эмбрионов — 84 раза.

Таким образом, в эмбриональном периоде, когда стволовые клетки интенсивно пролиферируют (Becker e. a., 1965), пролиферативный потенциал их постепенно снижается. Во взрослом организме, в котором пролиферация стволовых клеток незначительна, дальнейшее снижение способности к пролиферации выявить труднее. Оно было обнаружено в исследованиях с переносом костного мозга к мышам-мутантам W/W^v, у которых дефектны стволовые клетки. Здоровые стволовые клетки при трансплантации необлученным мутантам постепенно заменяют клеточные линии реципиента. Это дало возможность вести серийные трансплантации (1 раз в 12—16 мес) костного мозга от молодых и погибающих от старости мышей в организме мутантов свыше 5 лет (при продол-

жительности жизни мышей до 2 лет). Снижение способности к самоподдержанию (по числу КОЕс) у костного мозга от старых мышей (в сравнении с костным мозгом от молодых животных) выявилось лишь после 4-го пассажа, через 63—70 мес от начала опыта (Harrison, 1973).

Еще более четко возможность истощения пролиферативной способности стволовых клеток была выявлена при серийных трансплантациях в облученный организм смеси костного мозга от молодых и старых доноров, несущих различные хромосомные маркеры (Ogden, Micklem, 1976). При первых двух пассажах, производимых один раз в 8—10 недель, эффективно реопулируют около 100 стволовых кроветворных клеток, тогда как при последующих пассажах, несмотря на то, что вводится всегда одно и то же число стволовых кроветворных клеток, способность к клонообразованию сохраняется лишь у двух—пяти из них.

Эти данные доказывают, что стволовые кроветворные клетки обладают способностью к старению, к отсчету числа проделанных ими делений. Для удовлетворения потребностей в кроветворении стволовые клетки используются не случайно, а с учетом их возраста (Rosendaal e. a., 1976). В первую очередь мобилизуются в цикл более старые, т. е. проделавшие большее число делений, стволовые клетки, в значительной мере уже исчерпавшие свои пролиферативные возможности. После повторных введений оксимочевины, уничтожающей только клетки, находящиеся в периоде синтеза ДНК, все новые стволовые клетки мобилизуются в цикл и погибают в результате следующих введений цитостатика. Сохранившиеся после пяти доз препарата стволовые клетки оказываются более молодыми, судя по их функционально большей эффективности, по большей способности к самоподдержанию и продукции дифференцированного потомства (Rosendaal e. a., 1976). Механизм такой возрастной организации отдела стволовых клеток для использования не ясен. Он может быть связан с возрастанием чувствительности стволовых клеток к триггирующим их в цикл воздействиям по мере старения либо с наличием структурной организации в кроветворном микроокружении, в котором участки, индуцирующие пролиферацию стволовых клеток, длительное время заняты стволовыми клетками, вплоть до истощения их пролиферативного потенциала.

Обнаружение возрастной структуры отдела стволовых клеток ставит важный вопрос о том, можно ли вообще говорить о самоподдержании стволовых клеток. Сам этот термин подразумевает, что после деления исходной клетки образуются две новые клетки, полностью ей идентичные. Между тем из сказанного выше ясно, что это не так — вновь образовавшиеся клетки отличаются от исходной тем, что они в дальнейшем способны проделать на одно деление меньше, и в этом смысле новые клетки иные, более старые, поэтому использование термина «самоподдержание» не должно быть безоговорочным. Под ним подразумевают поддержание величины отдела стволовых клеток, но качественные характеристики отдела при этом могут меняться. Вопрос этот имеет не просто терминологическое значение. Ранее предполагалось, что обеспечение организма клетками, расходуемыми в течение жизни, может осуществляться двумя путями: либо клетки заготавливаются в эмбриогенезе впрок, на всю жизнь, и дальше только постепенно созревают (как, например, яйцеклетки), либо в эмбриогенезе готовится немного клеток, которые в дальнейшем самоподдерживаются. Последний путь использован, например, для стволовых кроветворных клеток. Обсуждавшиеся

выше данные показывают, что различия между этими двумя путями гн-стогенеза не столь существенны. В обоих случаях исходные клетки заготавливаются в эмбриогенезе впрок. Однако в первом из них заготовленные клетки теряют пролиферативную активность полностью, а во втором они сохраняют высокий пролиферативный потенциал, постепенно теряемый на протяжении жизни.

IV.1.4. Компетенция к различным дифференцировкам

Впервые предположение о полипотентности стволовой кроветворной клетки, о ее способности к дифференцировкам по всем направлениям гемопоэза, а также лимфопоэза было выдвинуто еще в 1909 г. А. А. Максимовым. Эта точка зрения получила подтверждение при использовании метода клонирования кроветворных клеток в селезенке облученных мышей.

Приведенные выше данные о способности КОЕс, например, из эритроидной колонии-клона дифференцироваться при ретрансплантации в эритроидные, гранулоцитарные и мегакариоцитарные клетки являются доказательством существования полипотентной стволовой кроветворной клетки, способной дифференцироваться по трем основным направлениям кроветворения. Прямое подтверждение наличия общего предшественника для клеток эритро- и гранулоцитопоэза было получено с помощью радиационных маркеров. При трансплантации маркированного костного мозга одни и тот же маркер удавалось обнаружить как в белых, так и в красных селезеночных колониях (Wu и др., 1967). Тканевые макрофаги также являются производными стволовых кроветворных клеток. У радиационных химер, полученных путем трансплантации костного мозга, макрофаги перитонеального экссудата (Balner, 1963), альвеолярные (Godleski, Brain, 1972), а также костномозговые, селезеночные, макрофаги лимфатических узлов, тимуса (Virolainen, Defendi, 1968) принадлежат донору костного мозга; имеют костномозговое происхождение и гистiocиты в очаге реакции гиперчувствительности замедленного типа, в раке и т. д. (Lubaroff, Waksman, 1968; Schmalzl и др., 1969). Удалось проследить дифференцировку моноцитов крови в альвеолярные макрофаги через стадию интерстициальных клеток *in vitro* в культуре легких мышей (Bowden, Adamson, 1972). При культивировании других тканей (лимфатические узлы, тимус новорожденных мышей), не содержащих стволовых кроветворных клеток, не обнаружено и клеток, способных дифференцироваться в макрофаги (Virolainen, Defendi, 1968). Данные о возможности возникновения макрофагов из лимфоцитов лимфатических узлов или грудного лимфатического протока не подтвердились.

Таким образом, клетки всех трех рядов кроветворения имеют общего предшественника — исходную полипотентную стволовую кроветворную клетку. Особенно важным с самого начала представлялся вопрос о том, обеспечивает ли стволовая кроветворная клетка и дифференцировку лимфоцитов. Иммунологические функции этой категории клеток, высокая степень их гетерогенности, связанная с синтезом каждым клоном антителообразующих клеток своего специфического полипептида (антигена), делали проблему особенно интересной. Полезно проследить, через какие этапы прошли посвященные ее решению исследования.

Уже в конце 50-х годов было обнаружено, что возникшие в результате облучения хромосомные перестройки могут обнаруживаться как в кроветворных, так и в лимфоидных клетках (Barnes e. a., 1959); во всех кроветворных тканях (в селезенке, костном мозге, тимусе, лимфатических узлах) обнаружены клоны с одним и тем же маркером. Эти эксперименты доказали, что в кроветворной системе существуют клетки, способные дифференцироваться как в миелоциты костного мозга, так и в лимфоциты различных лимфоидных органов. Характер дифференцировки кроветворной ткани в условиях трансплантации указывал на конкуренцию миелоидных и лимфоидных клеток за общего предшественника. Так, у полицитемических радиохимеров, у которых снижен эритропоэз, ускоряется восстановление лимфопоэза (Bryant, Cole, 1967); развитие острой вторичной болезни при трансплантации аллогенного костного мозга собакам и обезьянам препятствует нормальному гемопоэзу трансплантата, тогда как предотвращение острой вторичной болезни, например тимэктомией реципиента, восстанавливает образование клеток крови донорского происхождения (см. Чертков, 1976).

Доказательства того, что именно в костном мозге находятся клетки-предшественники лимфоцитов, были получены с использованием кариологической метки (T6T6). Исследования такого рода показали, что при введении радиохимерам костномозговых клеток (в количестве 10^5) вместе с клетками (10^7) из лимфатических узлов в лимфоидных органах первоначально обнаруживаются потомки клеток донора лимфатических узлов. Однако эти клетки не самоподдерживаются, и постепенно в тимусе и лимфоузлах их вытесняют потомки клеток донора костного мозга. Это показывает, что в костном мозге имеются клетки, способные к самоподдержанию, за счет которых обновляется лимфоидная ткань. Ни в одной из лимфоидных популяций (тимоциты, лимфоциты лимфатических узлов, грудного лимфатического протока) подобных клеток обнаружено не было (Barnes e. a., 1967).

В целом все эти исследования достаточно четко демонстрируют, что в костном мозге содержатся исходные для лимфоидной ткани клетки, отсутствующие в тимусе, лимфатических узлах и грудном лимфатическом протоке. Эти лимфоидные предшественники костномозгового происхождения участвуют в обновлении лимфоидной ткани не только после ее облучения, но, очевидно, и в нормальных условиях (Ford e. a., 1966). У мышей облучали только заднюю треть тела (доза 1000 рад), экранируя всю остальную часть тела, включая тимус. После этого им трансплантировали костномозговые клетки, маркированные T6T6-хромосомами. Костный мозг донора заселял в основном облученные участки, в передней, необлученной части тела его почти не было. Через 9—17 недель в тимусе появились митозы донорского происхождения. Это показывает, что в условиях, когда лимфоидная ткань не разрушена облучением, ее клетки не самоподдерживаются и постепенно пополняются за счет предшественников костномозгового происхождения. Однако это, конечно, еще не доказывает, что в качестве таких предшественников выступают именно стволовые кроветворные клетки или их потомки. Последнее может быть выяснено только при изучении клонированных клеточных популяций.

Первые исследования такого рода были осуществлены Трентиним и сотрудниками (Trentin e. a., 1967), которые показали, что клетки из селезеночных кроветворных колоний восстанавливают при ретрансплан-

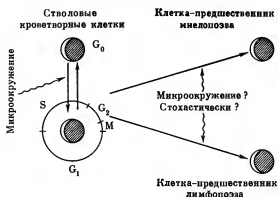


Рис. 26. Схема отдела стволовых клеток

Прямые стрелки показывают направление дифференцировки, волнистые — процессы, влияющие на дифференцировку

таци не только кроветворную, но и лимфоидную ткань, обеспечивая возможность иммунного ответа вторичных реципиентов на любой случайно взятый антиген. Это действительно доказывало бы, что образующие колонии клетки обладают способностью и к лимфоидным дифференцировкам, если бы в колониях не содержались бы клетки других линий, в частности диффузно распределенные по селезенке лимфоциты. Поэтому следовало проверить, не примешиваются ли к клонированным клеткам колоний лимфоидные предшественники извне. Это было сделано при использовании метода селезеночных колоний в комбинации с техникой радиационных маркеров. Удалось показать, что одни и те же маркеры обнаруживаются как в селезеночных колониях, так и в тимусе и лимфатических узлах облученных животных, получивших маркерный костный мозг. Так как митотическую активность в лимфатических узлах индуцировали в этих опытах введением антигена, ясно, что иммунокомпетентные лимфоидные клетки происходят из КОЕс либо обе эти клеточные категории имеют общую клетку-предшественника (Wu e. a., 1968). То же было получено и на модели розеткообразующих клеток — другой категории клеток лимфоидной ткани (Edwards e. a., 1970). И, наконец, было установлено, что клетки из маркированных эритроидных колоний при ретрансплантации способны передавать свои маркеры, т. е. дифференцироваться в лимфоциты, участвующие в иммунологических реакциях на трансплантированные антигены (Nowell e. a., 1970).

Таким образом, в результате тщательно проведенных поэтапных исследований проблему происхождения кроветворных клеток удалось решить. В кроветворной ткани взрослых животных существует единая стволовая кроветворная клетка, полипотентная и способная дифференцироваться по всем росткам кроветворения, а также образовывать клетки как гуморального, так и клеточного иммунитета (рис. 26). Это, однако, не исключает существования предшественников, коммитированных в отношении только некоторых путей дифференцировки и способных к длительному самоподдержанию. В частности, путем переноса Т6-маркера на генетическую основу С57BL удалось проследить влияние трансплантации костного мозга к необлученным мышам-мутантам W/W^x. У таких мышей поражены стволовые кроветворные клетки, в связи с чем костный мозг мышей дикого типа постепенно вытесняет кроветворные клетки даже у необлученных реципиентов. Оказалось (Harrison, Astle, 1976), что довольно быстро после трансплантации подавляющее боль-

шинство делящихся клеток в костном мозге, тимусе и селезенке принадлежит донору нормального костного мозга, тогда как в лимфатических узлах и пейеровых бляшках число донорских клеток невелико и не увеличивается с 3-го по 10-й мес после трансплантации. Можно предположить, что в этих органах клеточная популяция поддерживается за счет длительно самообновляющихся предшественников, отличных от стволовых кроветворных клеток.

Этот вывод следует и из интересных экспериментов (Ford *et al.*, 1975), осуществленных на тетрародительских (аллофенных) мышах. У таких химерных животных все ткани построены клетками — потомками от обеих пар родителей. Если бы стволовая кроветворная клетка была единственной для кроветворной ткани, то при этом надо было бы ожидать равномерного мозаицизма во всех кроветворных тканях каждой данной химеры. Между тем мозаицизм костного мозга, тимуса, пейеровых бляшек отличался от такового в селезенке и лимфатических узлах. Из всех этих данных может следовать, что наряду с исходной полипотентной стволовой кроветворной клеткой могут существовать и обладающие стволовыми свойствами коммитированные предшественники двух типов — миелопоэза и лимфопоэза.

IV.1.5. Эмбриогенез

Каково происхождение стволовой кроветворной клетки взрослого организма? Представляет ли она единую, однажды возникшую в эмбриогенезе и далее самоподдерживающуюся клеточную линию или по мере онтогенетического развития происходит повторное образование стволовых кроветворных клеток из более примитивных тканевых предшественников?

Подробно эти вопросы изучены на кроветворной системе мышей. Впервые стволовая кроветворная клетка КОЕс и ее более зрелый потомок — предшественник гранулоцитов и макрофагов КОЕк (колониеобразующая единица в культуре) — обнаруживаются в желточном мешке 7—8-дневных эмбрионов. У 10-дневного эмбриона КОЕс и КОЕк появляются в крови и печени (Metcalf, Moore, 1971). В последний содержание КОЕс непрерывно нарастает: с 12-го дня по 18-й день эмбриональной жизни число КОЕс в печени увеличивается с 75 до 1500. В течение первого месяца внеутробной жизни КОЕс из печени исчезают. В селезенке КОЕс обнаруживаются уже у 15-дневного эмбриона; содержание их в ней растет во время эмбриогенеза и достигает 600 к моменту рождения. Число КОЕс продолжает нарастать и у молодых мышей (3—4 мес) составляет 5000 на селезенку (Pozzi *et al.*, 1972).

В ходе индивидуального развития свойства стволовых кроветворных клеток меняются. Эмбриональные стволовые клетки более радиорезистентны, чем взрослые: для взрослых КОЕс из костного мозга и селезенки D_{50} составляет 90—95 рад, а для КОЕс из эмбриональной печени — 150 рад (Siminovitch *et al.*, 1965). Для эмбриональных КОЕс величина f составляет 9,6%, для взрослых КОЕс — 14% (Kubaneck *et al.*, 1970). КОЕс от животных разного возраста образуют эритроидные клетки, которые по-разному синтезируют гемоглобин. Размер эритроцитов, произведенных кроветворными клетками желточного мешка, меньше, чем размер эритроцитов, дифференцирующихся из клеток эмбриональной печени, и

они содержат взрослый гемоглобин, тогда как более крупные — эмбриональный (Patton e. a., 1969). По типу продуцируемого дифференцирующимися клетками гемоглобина стволовые клетки эмбриональной печени отличаются от более поздних (печень новорожденных) (Niewisch e. a., 1970). После введения одного и того же числа КОЕс потребление радиоактивного железа оказывается существенно большим при введении эмбриональных клеток по сравнению со взрослыми (Kubaneck e. a., 1969).

Все эти данные можно объяснить либо тем, что стволовые клетки меняют свои свойства по мере взросления и смены мест обитания (желточный мешок — эмбриональная печень — взрослый костный мозг), либо тем, что в процессе эмбриогенеза несколько раз независимо возникают новые линии стволовых клеток. Имеются серьезные экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу первой возможности. Выше указывалось, что КОЕс из эмбриональной печени обладают повышенной радиорезистентностью. Если им позволить пролиферировать в смертельно облученном организме, то их прямые потомки уже в течение первой недели приобретают радиочувствительность, присущую костномозговым КОЕс (Siminovitsh e. a., 1965).

Использование методов фракционирования клеток сначала по плавучей плотности, а затем по размеру позволило разделить КОЕс из эмбриональной печени и из взрослого костного мозга на ряд субпопуляций (три — для печени и шесть — для костного мозга), различающихся по ряду признаков: модальному объему клеток, величине, пролиферативной активности, чувствительности к угнетающему действию плеторы на эритропоэз (Haskill, 1971). Комбинации этих признаков являются «отпечатками пальцев» соответствующих субпопуляций КОЕс. Выяснилось, что самые ранние КОЕс (обнаруженные только у 10-дневных эмбрионов) после трансплантации дают все типы КОЕс, а сами исчезают; более поздние эмбриональные КОЕс самоподдерживаются и, кроме того, продуцируют КОЕс взрослого типа, тогда как при трансплантации взрослых КОЕс образуются только взрослые КОЕс, но никогда — эмбриональные. Все это служит серьезными аргументами в пользу наличия единой линии стволовых кроветворных клеток и их постепенного созревания.

Более прямые данные были получены при культивировании эмбрионов (Moore, Metcalf, 1970). КОЕс в желточном мешке 8-дневных эмбрионов обнаруживаются в концентрации 1,44 на 10^6 клеток. Через три дня их концентрация возрастает в желточном мешке почти в 3 раза, а еще через два дня (13-дневный эмбрион) КОЕс исчезают из желточного мешка. У 10-дневных эмбрионов КОЕс появляются в крови и печени. При культивировании 7-дневных эмбрионов последние успешно развиваются, у них возрастает и число КОЕс, но при обязательном условии наличия желточного мешка. Если эмбрион культивируют без желточного мешка, число КОЕс не возрастает и они не появляются ни в крови, ни в печени. При введении в культуру клеток желточного мешка, КОЕс появляются в печени эмбриона. Эти данные хорошо соответствуют представлению о возникновении стволовых клеток в желточном мешке и последующей их миграции с кровью в печень, а оттуда — в костный мозг.

Изменение свойств КОЕс обусловлено, очевидно, сменой мест их обитания; индуктивные воздействия различного микроокружения (желточный мешок, эмбриональная печень, взрослый костный мозг) вызывают изменения в стволовых кроветворных клетках (Moore, Metcalf, 1970).

Вместе с тем, находясь в пределах одного органа, популяция стволовых клеток может менять свои свойства. Это было показано методом органических культур, который впервые дал возможность получить достаточно длительное поддержание кроветворения в культурах эмбриональной печени (Luria e. a., 1969) с сохранением там пролиферирующих стволовых кроветворных клеток (Luria e. a., 1971). При этом оказалось, что КОЕс меняют свои свойства по мере «взросления» в культуре. В качестве параметра была избрана способность КОЕс эмбриональной печени в отличие от взрослых КОЕс продуцировать эритроидные колонии в полицитическом организме, в котором полностью угнетено красное кроветворение. Как оказалось, культивированные в течение 12 и 13 дней кроветворные клетки «позрели» и по чувствительности к действию пеллоиды приобрели характеристики взрослых КОЕс, хотя никакой смены места кроветворения (печеночный эпителий) здесь не было (Latsinik e. a., 1971). Отсюда следует, что изменение по крайней мере некоторых характеристик стволовых клеток является внутренним свойством, обусловленным их способностью к определению своего возраста (или числа проведенных делений).

Индуктивные воздействия, приводящие к дифференцировке кровяных островков желточного мешка, приводят к одновременному образованию, видимо, нескольких, а не одной стволовой клетки. Исследование аллофенных (тетрародительских) мышей показали, что у них часто наблюдается эритроцитарная мозаика, т. е. одна часть их эритроцитов происходит от одной пары родителей, а другая — от второй (Mintz, Palm, 1969). Это доказывает, что предшественники эритроцитов происходят в эмбриогенезе не из одного, а из нескольких клонов клеток.

В целом имеющиеся данные служат свидетельством того, что стволовые кроветворные клетки взрослых животных происходят из примитивных предшественников, имеющих в желточном мешке, и в последующем репопулируют по всей кроветворной системе.

IV.2. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА СТВОЛОВОЙ КРОВЕТВОРНОЙ КЛЕТКИ

Процесс дифференцировки стволовых кроветворных клеток имеет много стадий. В этом процессе стволовая клетка теряет способность к самоподдержанию, коммитируется, т. е. ограничивается в возможностях выбора направления дифференцировки, меняет тип регуляции и т. д. Число и последовательность стадий дифференцировки пока изучены недостаточно для построения полных рядов гистогенезов тех или иных серий кроветворных клеток. Более или менее детально изучен процесс эритроидной дифференцировки.

IV.2.1. Дифференцировка в эритроидном направлении

Дифференцировка эритроидных клеток изучена наиболее полно по сравнению с другими рядами кроветворения. Однако учитывая, что этот вопрос выходит за пределы проблем иммунитета, в данной книге он рассмотрен очень кратко.

Установление того факта, что эритропоэз регулируется главным образом дальнедействующим механизмом с помощью гормона эритропоэтина, позволило использовать величину эритропоэтического ответа у животных на тест-дозу эритропоэтина в качестве относительной меры величины популяции клеток-предшественников эритроцитов.

Было показано, что КОЕс и отвечающие на эритропоэтин клетки не идентичны. Особенно четко это выявляется в опытах на облученных животных с регенерирующим костным мозгом, когда легко посчитать число имеющихся КОЕс. Оказалось, что в ответ на эритропоэтин возникает такое количество эритробластов, которое не может образоваться из имеющихся стволовых клеток путем деления даже с максимально допустимой для клеток млекопитающих скоростью (Schooley, 1966).

Таким образом, мишенью действия эритропоэтина служат клетки, отличающиеся от КОЕс и существенно более многочисленные. С другой стороны, скорость роста популяции КОЕс после облучения и трансплантации кроветворных клеток одинакова как у нормальных, так и у полицитемических мышей, у которых эритропоэтин практически отсутствует (Pozzi, Silini, 1968). Отсюда следует, что КОЕс не зависят от эритропоэтина и не являются эритропоэтинчувствительными клетками.

Совокупность этих данных позволяет утверждать, что эритропоэтин действует не на стволовые кроветворные клетки и, следовательно, существуют предшественники, коммитированные к эритропоэзу. Развитие в последние годы клональные методы определения эритропоэтинчувствительных клеток прямо подтвердили такое заключение. Оказалось, что к категории эритропоэтинчувствительных клеток относятся по меньшей мере три вида предшественников. Видимо, наименее дифференцированный из них определяется методом селезеночных колоний. При сублетальном облучении мышей с последующей кровопотерей или повторным введением эритропоэтина в селезенке через 4—6 дней развивается много мелких эндогенных эритроидных колоний, содержащих по 10^4 — 10^5 клеток. Через девять дней эти колонии уже не выявляются, в связи с чем образующий их предшественник был назван колониеобразующей единицей, дающей транзиторные эндогенные колонии, — КОЕтэ (Gregory, e. a., 1975).

Образование КОЕтэ из стволовых клеток эритропоэтиннезависимо: оно не нарушается плеторой. По мере созревания чувствительность потомков КОЕтэ к эритропоэтину повышается. Возможно, КОЕтэ — резервный предшественник, активирующийся только при эритропоэтических стрессах и не участвующий в гистогенезе при стабильном кроветворении. Видимо, в норме первым эритроидным предшественником является бурстообразующая единица — БОЕэ (Axelrad e. a., 1974). Этот предшественник выявлен в культуре. При культивировании кроветворных клеток в плазменном геле в присутствии высоких концентраций эритропоэтина (порядка 3—10 ед/мл) образуются колонии из эритроидных клеток, достигающие к 7—9-му дню величины в несколько сот клеток, расположенных в виде многих более мелких колоний (отсюда и название *burst* — взрыв). Эти клетки отличаются от более дифференцированных эритроидных предшественников (КОЕэ) большей способностью к самоподдержанию (они проделявают в культуре до 13 митотических делений, судя по тому, что максимальный размер колонии достигает 10^4 клеток), меньшей чувствительностью к эритропоэтину, меньшими размерами (Terreghian e. a., 1974; Iscove, Sieber, 1975). Co-

держанне БОЕэ в костном мозге примерно в 10 раз меньше, чем КОЕэ. Совокупность этих данных позволяет считать БОЕэ первым (или одним из первых) шагом дифференцировки стволовых клеток в эритропоэтическом направлении. Продукция БОЕэ из стволовых клеток не зависит от эритропоэтина, и содержание их у полицитемических животных не снижено. Однако их дальнейшая судьба и в первую очередь число митотических делений регулируются эритропоэтином.

Следующий по зрелости эритроидный предшественник — клетка, способная в плазменных культурах за два дня пролиферации в присутствии относительно низких концентраций эритропоэтина (0,25 ед/мл) образовывать из эритроидных элементов колонию величиной 4—32 клетки. Этот предшественник (КОЕэ) больше проэритробластов по размеру, а содержание его в костном мозге ниже, чем содержание проэритробластов (Торреган е. а., 1974). Он более чувствителен к эритропоэтину, чем БОЕэ. Решающее его отличие от более раннего предшественника — зависимость от эритропоэтина. Дифференцировка этого предшественника происходит под влиянием эритропоэтина, без гормона он не образуется, у полицитемических животных КОЕэ отсутствует (Gregory е. а., 1973). Схемы эритроидных дифференцировок приведены на рис. 27.

Все категории эритропоэтинчувствительных клеток характеризуются высокой пролиферативной активностью. Опыты с тимидиновым «самобуйством» показали, что в каждый данный момент до 70% таких клеток находится в периоде синтеза ДНК, что говорит о их очень высокой пролиферативной активности (Porteous, Lajtha, 1968).

IV.2.2. Дифференцировка в гранулоцитарном направлении

Это направление дифференцировки изучено существенно хуже эритроидного как в связи с отсутствием избирательного для линии маркера (как, например, радиоактивное железо для эритропоэза), так и из-за невозможности блокировать гранулоцитопоз в такой мере, как это легко достигается полицитемией при эритропоэзе. Однако полученные данные все же достаточны для утверждения, что принципиально характер дифференцировок в этом ряду очень близок таковому в процессе эритропоэза. Действительно, в результате первого шага дифференцировки стволовой клетки в гранулоцитарном направлении возникает коммитированный предшественник, колониеобразующая единица в культуре (КОЕК). Эта клетка способна давать колонии размером до нескольких тысяч клеток при культивировании на полутвердых средах в присутствии гуморального стимулятора (колониестимулирующая активность—КСА). Таким образом, как и эритроидные предшественники, КОЕК регулируется гормонально, причем КСА вызывает как пролиферацию ее, так и дифференцировку (Sachs, 1974). КОЕК характеризуется высокой пролиферативной активностью. При стабильном кроветворении около 40% КОЕК находится в периоде синтеза ДНК. После возмущающих воздействий, например после облучения, пролиферация их ускоряется и доля клеток в S-периоде может достигать 70%. В отличие от эритроидных предшественников КОЕК является исходным звеном для дифференцировок не одной, а двух клеточных линий — гранулоцитов всех трех типов (нейтрофильных, базофильных, эозинофильных) и макрофагов, являю-

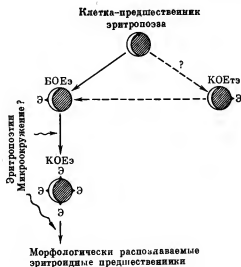


Рис. 27. Схема дифференцировки эритроидных предшественников

БОЕэ — эритроидный предшественник, дающий колонии после культивирования с эритропоэтином;

КОЕэ — эритроидный предшественник, дающий колонии после двух дней культивирования с эритропоэтином в низких концентрациях;

Э — рецептор эритропоэтина.

Прямые стрелки показывают направление дифференцировки, пунктирные — возможный вариант дифференцировки

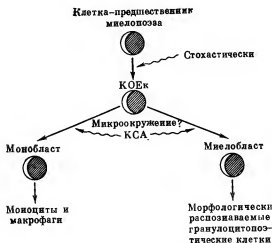


Рис. 28. Схема дифференцировки предшественников гранулоцитов и макрофагов

КОЕк — ранний предшественник гранулоцитов и макрофагов, дающий колонии в культуре в присутствии фактора, стимулирующего образование колоний (КСА).

Обозначение стрелок то же, что на рис. 26

щихся прямыми потомками моноцитов крови (рис. 28). Механизм переключения дифференцировок КОЕк с гранулоцитарного на макрофагальный путь и наоборот неясен. Показано, что макрофаги-моноциты выделяют КСА, под влиянием которой КОЕк дифференцируется в основном в гранулоциты. Последние, напротив, вырабатывают ингибитор, в результате действия которого не только снижается число колоний, но и возрастает их дифференцировка в макрофагальном направлении. Такие реципрокные отношения могут лежать в основе саморегуляции направления дифференцировки этого предшественника.

Отдел КОЕк не однороден и также, видимо, включает несколько стадий дифференцировки. Можно предположить, что последней из них, непосредственно предшествующий миелобласту, является кластеробразующая единица — клетка, способная в культуре дать колонию, состоящую

только из нескольких десятков клеток (менее 50). Подробно данные о КОЕк можно найти в монографиях Меткалфа и Мура (Metcalf, Moore, 1971) и И. Л. Черткова, А. Я. Фриденштейна (1977).

IV.2.3. Дифференцировка в лимфоидном направлении

К сожалению, именно для этого, важнейшего в иммунологии направления дифференцировки стволовых клеток, пока нет данных, позволяющих сколько-нибудь детально охарактеризовать гистогенез лимфоцитов. Обусловлено это в первую очередь отсутствием клональных методов исследования. Только в последние два года удалось получить в культуре лимфоидные колонии, состоящие из В- (Metcalf e. a., 1975) или Т- (Rosenszajn e. a., 1975) лимфоцитов. Однако большая частота клеток, продуцирующих лимфоидные колонии, доказывает, что они не являются предшественниками лимфоцитов, занимающими в гистогенетическом ряду положение, аналогичное, например, эритропоэтинчувствительным клеткам. Речь идет о более зрелых членах ряда, пролиферация которых регулируется антигеном. Рассмотрение этих проблем не входит в задачу настоящего обзора.

В гистогенезе лимфоидных клеток, видимо, есть стадия общей клетки-предшественника как Т-, так и В-лимфоцитов. Эмбриональная печень при трансплантации аллогенному реципиенту (гибриду F_1) не вызывает у него вторичной болезни, так как возникающие иммунологически компетентные клетки оказываются иммунологически толерантными. Однако через 60 дней пролиферации в таком реципиенте продуцируются клетки, содержащиеся в селезенке и лимфатических узлах, которые способны вызывать при переносе к вторичному реципиенту того же генотипа реакцию «трансплантат против хозяина». Отсюда можно заключить, что существует какая-то стадия дифференцировки стволовой кроветворной клетки, промежуточная между последней и зрелой, иммунологически компетентной клеткой, характеризующаяся тем, что клетка не способна стать толерантной, и ее потомки оказываются иммунологически компетентными против антигенов реципиента (Туап, 1969). Дифференцируются эти клетки-предшественники в костном мозге и лишь оттуда поступают в периферические лимфоидные органы (Nossal, Pike, 1973), что подтверждает их гистогенетическую близость к стволовым кроветворным клеткам. И, наконец, при разделении клеток в изопикнических или в изокинетических градиентах удалось показать, что предшественники как Т-, так и В-лимфоцитов имеют одинаковую плотность (порядка $1,064 \text{ г/см}^3$), причем они тяжелее КОЕс ($1,060 \text{ г/см}^3$), легче зрелых Т-лимфоцитов ($1,069 \text{ г/см}^3$) и оседают в изокинетическом градиенте бычьего сывороточного альбумина с одинаковой скоростью — 3 мм/час (Miller, Phillips, 1970; El-Agini, Osoba, 1973; Lafleur e. a., 1973).

Подтверждается существование этого предшественника и наличием дифференцировочного антигена, общего для молодых Т- и В-лимфоцитов (Yutoku e. a., 1975). Неясно, идет ли речь о клетке-предшественнике лимфопоэза, возможной стволовой лимфоидной клетке (см. раздел IV.1.4), или это уже более поздний продукт ее дифференцировки. Трудно также сказать, на каком этапе происходит коммитирование лимфоидного предшественника на клетки родоначальницы Т- и В-лимфоцитов соответственно. Тем более нет данных о том, регулируется ли пролифе-

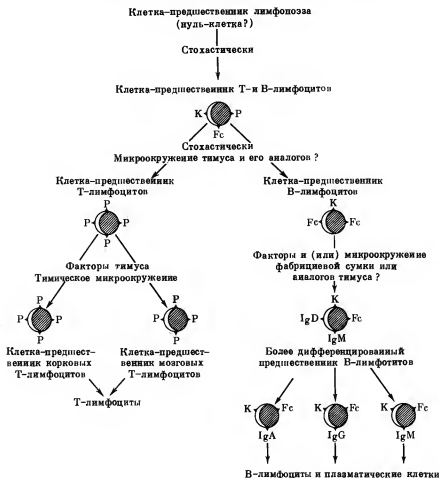


Рис. 29. Схема дифференцировки лимфоидных предшественников (Davis, 1975, модифицировано)

K — рецептор для третьего компонента комплемента; *P* — рецептор для эритроцитов барана; *Fc* — рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, а также агрегированных молекул IgG и комплекса антиген — антитело

рация и дифференцировка этих предшественников, есть ли гормональная регуляция в этом отделе (по аналогии со всеми остальными направлениями дифференцировки стволовой клетки), какие гормоны в ней участвуют, в частности не обладает ли такими свойствами один из гормонов тимуса, фабрициевой сумки и т. д.

Поэтому схему дифференцировок в лимфоидном направлении сегодня можно рассматривать только как гипотетическую (рис. 29). В основу ее положены антигенные свойства предшественников, наличие различных рецепторов, аналогии с клетками злокачественных лимфопролиферативных заболеваний (Davis, 1975; Goldschneider, 1976).

Предполагается, что одно из первых мест в гистогенетическом ряду лимфоидных дифференцировок занимают так называемые 0-клетки, не

несущие поверхностных маркеров ии Т-, ии В-клеток. Видимо, 0-клетки очень быстро коммитируются и дифференцируются в клетки-предшественники Т- и В-лимфопозза. Такое заключение основано на крайней клинической редкости гипогаммаглобулинемии при остром лимфолейкозе, поражающем преимущественно Т-клетки, и редкости снижения клеточного иммунитета в большинстве случаев агаммаглобулинемии, поражающей В-клетки (Davis, 1975). Несмотря на это, выявление в крови клеток, несущих как поверхностные иммуноглобулины, так и рецепторы для эритроцитов барана, т. е. обладающих свойствами и Т- и В-клеток, является аргументом в пользу наличия общего предшественника обоих этих направлений лимфопозза. По морфологии 0-клетки похожи на малые и середине лимфоциты.

Следующий шаг дифференцировки — образование отдельных предшественников для Т- и В-лимфоцитов. Предшественник Т-лимфоцитов несет на поверхности рецепторы для эритроцитов барана; число их увеличивается по мере созревания этого предшественника. По дифференцировочным антигенам на этой стадии происходит дальнейшая дифференцировка предшественника с образованием клеток-предшественников отдельно для мозговых и корковых лимфоцитов тимуса, которые представляют собой не последовательные стадии гистогенеза, а две независимые популяции Т-лимфоцитов. Обе эти популяции требуют для своего развития различного микроокружения. В частности, в селезенке преимущественно развиваются короткоживущие, кортизончувствительные корковые Т-лимфоциты, тогда как в лимфатических узлах — долгоживущие, кортизонрезистентные мозговые Т-лимфоциты (Goldschneider, 1976).

В ряду дифференцировки В-клеток различают ряд стадий. Первая из них дает предшественник, несущий на поверхности рецепторы для Fc-фрагмента агрегированных иммуноглобулинов и комплексов антигена — антитела (Fc) и третьего компонента комплемента (к). Из него дифференцируется клетка, несущая Fc, к, рецепторы для IgD (δ) и IgM (μ). И, наконец, этот предшественник дифференцируется в три категории В-лимфоцитов; все они характеризуются наличием Fc- и к-рецепторов и, кроме того, содержат либо рецептор α (для IgA), либо γ (для IgG), либо μ .

Такая схема лимфоидных дифференцировок позволяет предполагать, какие лимфоидные мишени поражаются при тех или иных заболеваниях лимфоидной ткани.

При комбинированных иммунодефицитных состояниях, при которых отсутствуют как Т-, так и В-клетки, поражена, видимо, стволовая кроветворная клетка. Это подтверждается способностью костного мозга, трансплантированного таким больным, излечивать иммунодефицит. Поражение ранних клеток-предшественников Т- или В-лимфоцитов происходит, видимо, при остром лимфолейкозе и агаммаглобулинемии. Поражение следующего предшественника в ряду Т-клеток наблюдается при хроническом лимфолейкозе (Т-клеточная форма), а в ряду В-клеток — при В-клеточном хроническом лимфолейкозе, не несущем иммуноглобулиновых маркеров, и при некоторых формах агаммаглобулинемии. При синдроме Сезари поражается, видимо, более зрелый предшественник Т-лимфоцитов, чем при хроническом Т-клеточном лимфолейкозе, так как злокачественные клетки при этом заболевании дают простые розетки с эритроцитами барана (60—90% всех клеток) при отсутствии на поверхности Fc и иммуноглобулинов. И, наконец, при поражении наиболее

зрелых клеток В-ряда развиваются заболевания типа нодулярной лимфомы, В-клеточного хронического лимфолейкоза (вариант с иммуноглобулинами на клеточной поверхности), лимфомы Бэркитта и некоторые формы агаммаглобулинемии (Davis, 1975).

IV.3. РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

Можно считать доказанным, что исходным элементом всей системы клеток крови является стволовая клетка, полипотентная, способная к многочисленным разнообразным дифференцировкам и в то же время обладающая способностью к самоподдержанию, т. е. к пролиферации без видимой дифференцировки. Отсюда следует, что принципы управления системой кроветворения должны обеспечивать такую ее регуляцию, в результате которой при стабильном кроветворении выполняются следующие два основных условия: число продуцируемых клеток каждого типа постоянно и строго соответствует числу погибших зрелых клеток; число стволовых клеток постоянно, и образование новых стволовых клеток точно соответствует числу их, ушедших в дифференцировку. Еще более сложные задачи решаются при стабилизации системы после возмущающего воздействия. В этом случае число образующихся стволовых клеток должно превышать число ушедших в дифференцировку до тех пор, пока величина отдела не достигает исходного уровня, после чего вновь должны быть установлены сбалансированные отношения между числом новообразующихся и дифференцирующихся стволовых клеток. С другой стороны, дифференцировка стволовых клеток должна регулироваться так, чтобы восстановить число зрелых клеток только того ряда, который оказался уменьшенным (например, эритроидные клетки после кровопотери) при стабильной продукции других клеток. И здесь после усиленного новообразования данной категории клеток ее продукция должна быть снижена до сбалансированного уровня.

Один из основных принципов устройства кроветворной системы состоит в том, что она построена из ряда отделов. Между стволовыми клетками и зрелыми клетками располагаются многие промежуточные ступени дифференцировки, каждая из которых имеет свой особый тип и механизм регуляции. Сложнейшая задача, строго соответствующая запросу регуляции и пролиферации и дифференцировки стволовых клеток решается последовательно, на нескольких этапах. На каждом из них решаются относительно простые задачи, что резко ограничивает число вариантов «выбора» клеткой соответствующего решения. В частности, качественная регуляция кроветворения, т. е. обеспечение как самоподдержания системы в целом, так и снабжения ее всеми типами предшественников, осуществляется в отделе стволовых клеток. Количественная регуляция кроветворения, т. е. обеспечение образования необходимого числа клеток нужного типа в определенное время, осуществляется в последующих отделах, прежде всего в отделе коммитированных предшественников.

IV.3.1. Регуляция пролиферации

Стволовая клетка обладает двумя основными свойствами: способностью к самоподдержанию, достаточно длительному, сравнимому со временем существования всего многоклеточного организма, и способностью к дифференцировке. Так как последняя, видимо, необратима, «принявшая решение» о дифференцировке стволовая клетка необратимо покидает отдел. Итак, важнейшая проблема регуляции в этом отделе состоит в том, чтобы при повышении запроса дифференцировке не подвергались бы все стволовые клетки, после чего регенерация кроветворения оказалась бы невозможной в связи с истощением способных к самоподдержанию элементов, так как клетки всех последующих отделов к длительному самоподдержанию не способны. Такая регуляция в организме действительно существует. После облучения в высоких дозах практически вся кроветворная система погибает. Между тем, например, у мыши, регенерация возможна после того, как облучением уничтожено 99,9% всех стволовых клеток (Bond e. a., 1965). Несмотря на огромный запрос на дифференцировку, сохранившиеся 0,1% стволовых клеток восстанавливают свое число и обеспечивают резкое повышение дифференцировки клеток последующих отделов.

Достигается это прежде всего за счет ускорения пролиферации стволовых клеток. При стабильном кроветворении стволовые клетки пролиферируют медленно или вообще большая часть их находится в стадии покоя, вне клеточного цикла. При регенерации темп пролиферации стволовых клеток, или доля их, находящаяся в клеточном цикле, резко возрастает. Однако этого недостаточно для увеличения общего числа стволовых клеток. Действительно, при стабильном кроветворении число стволовых клеток поддерживается постоянным. Это значит, что для стволовых клеток вероятность остаться стволовой клеткой (P) из расчета на один генерационный цикл равна 0,5; в результате каждого деления в среднем на одну новообразованную стволовую клетку приходится одна ушедшая в дифференцировку стволовая клетка. Ясно, что если величина P оставалась бы неизменной, то общее число стволовых клеток не могло бы увеличиваться. Ускорение пролиферации привело бы только к повышению продукции зрелых клеток. Отсюда следует, что при снижении общего числа стволовых клеток регулируются два параметра — темп пролиферации стволовых клеток и вероятность для них остаться стволовой клеткой после митоза из расчета на один генерационный цикл.

Одна из наиболее интересных моделей регуляции пролиферации стволовых клеток (модель индуцирующего кроветворение микроокружения) основана на гипотезе, согласно которой пролиферация стволовых клеток происходит под влиянием специального индуктора, выделяемого микроокружением кроветворных клеток (Matioli e. a., 1973). Предполагается, что в кроветворной ткани содержится специальная популяция радиорезистентных клеток-источников, вырабатывающих фактор, вызывающий самообновление стволовых клеток, т. е. их деление без потери своих свойств, без дифференцировки. Такие клетки равномерно распределены по кроветворным органам. Выделяемый ими фактор неустоек и в среде не сохраняется или из среды не проникает в стволовые клетки. Поэтому передача фактора, его внутриклеточная микродиффузия, возможны только при прямом контакте «источника» со стволовой клеткой.

В результате возникает слабое взаимодействие таких двух клеток за счет стереохимической комплементарности между макромолекулярным комплексом на поверхности источника и стволовой клеткой.

Вторым следствием соединения стволовой клетки с источником является существенное повышение проницаемости мембран клеток в месте контакта, что облегчает микродиффузию фактора. Когда концентрация его внутри стволовой клетки превышает пороговый уровень, стволовая клетка делится с образованием двух новых стволовых клеток. Одна из них прямо контактирует с источником, другая — через первую стволовую клетку. Далее события повторяются, и от каждого источника стволовые клетки растут в виде ветви. Чем дальше от источника находится стволовая клетка, тем меньше у нее шансов накопить индуктор в концентрации выше пороговой. Без фактора стволовые клетки через некоторое время подвергаются дифференцировке и, следовательно, выходят из отдела стволовых клеток. Вероятность самообновления определяется не только расстоянием стволовой клетки от источника, но и наличием других клеток. Так, скопление дифференцирующихся клеток может разорвать нить стволовых клеток, прекращая тем самым микродиффузию и дифференцируя стволовые клетки, расположенные за местом перерыва. Таким образом, в этой модели регуляция пролиферации и дифференцировки стволовых клеток осуществляется микроокружением, т. е. совокупностью локальных условий в микроучастке кроветворения, включая в эту совокупность и клеточные факторы, в частности число предшественников и более зрелых клеток, наличие популяции управляющих клеток стромального происхождения и т. д.

Представление о клеточных кооперациях, регулирующих кроветворение, в частности о взаимодействии стромальных клеток-источников со стволовыми клетками, кажется весьма привлекательным. Действительно, стромальные клетки существенно более устойчивы к самым разнообразным повреждающим воздействиям, чем стволовые, да и вообще льюбые кроветворные клетки.

Поэтому после повреждения, когда строма обнажена, для сохранившихся стволовых клеток возрастает вероятность контакта со стромальным источником, что и повышает долю пролиферирующих стволовых клеток. Менее ясен вопрос, почему одновременно снижается вероятность дифференцировки стромальных клеток. Приходится либо допустить, что чем выше концентрация индуктора (т. е. чем ближе стволовая клетка находится к стромальной в развивающейся цепи стволовых клеток), тем ниже для нее вероятность дифференцировки, либо что повреждение так влияет на стромальные клетки, что они начинают вырабатывать особый индуктор, в норме не продуцируемый, который снижает вероятность дифференцировки в стволовых клетках.

Допустима и третья, наиболее привлекательная возможность (Чертков, 1976). Значение вероятности $P=0,5$ при стабильном кроветворении обеспечивается средней стабильной величиной генерационного цикла. Индукция пролиферации стволовых клеток естественно снижает эту величину. За время сокращенного цикла меньшая доля стволовых клеток успевает принять решение о дифференцировке. В этом случае регуляция величины P может осуществляться автоматически — чем быстрее пролиферируют стволовые клетки, чем меньше их среднее время генерации, тем выше величина P , тем быстрее растет общая величина отдела стволовых клеток. По мере увеличения числа стволовых клеток (а следова-

тельно, и числа продуцируемых ими потомков) все больше индукторов оказываются блокированными, средний темп пролиферации стволовых клеток замедляется, величина P снижается до стабильного (0,5) уровня. Как видно, такое предположение позволяет объяснить всю регуляцию отдела стволовых клеток одним естественным механизмом, достаточно просто и, следовательно, надежно функционирующим, — взаимодействием стромальных клеток кроветворного микроокружения и стволовых кроветворных клеток. Общее число последних поддерживается на одном и том же уровне за счет стабильного размера величины кроветворного микроокружения. Отдел стволовых клеток увеличивается вплоть до момента, когда микроокружение оказывается занятым стволовыми клетками и их потомками.

IV.3.2. Регуляция дифференцировки

Следующий важный вопрос, который возникает при рассмотрении принципов управления кроветворной системой, относится к регуляции дифференцировки стволовых клеток. Действительно, все сказанное выше относится лишь к проблеме, как регулируется осуществление стволовыми клетками выбора: останутся ли они стволовыми или начнут дифференцировку. Между тем дифференцировки вообще не бывает, она всегда конкретна. Стволовая клетка полипотентна, т. е. способна к дифференцировке по многим направлениям. Как же осуществляется выбор между этими «разрешенными» для стволовой клетки (т. е. обеспеченными ее геном) путями?

Первый шаг дифференцировки стволовых клеток, приводящий к образованию самых ранних предшественников, не зависит от запроса. Так, например, при высокой полицитемии эритропоэз (о котором судят по числу морфологически распознаваемых эритроидных предшественников) полностью блокирован. Между тем ток клеток из стволового отдела в отдел ранних эритроидных предшественников при полицитемии не только сохранен, но даже не снижен (Schooley, 1966). Есть и другие аналогичные данные. Ранние предшественники всех рядов кроветворения обнаруживаются с одинаковой частотой во всех участках кроветворения, даже там, где в силу тех или иных причин реализуется практически только один путь кроветворения (гранулоцитопоэз в миелоидных колониях в селезенке, эритропоэз в эмбриональной печени и т. д.).

Отсюда следует, что, как это ни кажется удивительным, направление дифференцировки стволовых клеток, возможно, не регулируется. Процесс этот полностью стохастичен, имеет вероятностный характер, и частота соответствующих дифференцировок стабильна и, видимо, закреплена генетически. При любых экстремальных ситуациях, при резком повышении запроса на дифференцированные клетки только одного ряда отдел стволовых клеток не отвечает усилением тока соответствующих предшественников. Образуются все типы предшественников с прежним стабильным относительным распределением их.

Из стохастической модели кроветворения следует, что количественная регуляция кроветворения не может осуществляться в отделе стволовых клеток. Количественная регуляция имеет своей главной мишенью клетки следующего отдела кроветворной системы — коммитированные постинчувствительные предшественники, т. е. клетки, уже выбравшие направление дифференцировки путем стохастического процесса в ство-

ловых клетках, которые сами по себе спонтанно дифференцировке не подвергаются. Они, видимо, имеют ограниченный жизненный цикл и быстро погибают, проделав только ограниченное число делений. Естественно поэтому, что стохастическое образование предшественников даже в отсутствие запроса не приводит к перепроизводству этих клеток, к их избыточному накоплению — они быстро элиминируются. Для того чтобы коммитированные предшественники начали дифференцировку, путь которой был избран ими ранее стохастично, необходимо второе событие — приложение к ним специфического гормона-индуктора. Продукция последнего индуцируется запросом и, следовательно, не случайна. Итак, дифференцировка стволовой клетки в зрелую — процесс двухстадийный, в котором первый этап стохастичен, а второй специально индуцирован.

Как видно из сказанного, двухстадийность дифференцировки стволовых клеток позволила выработать эволюционно весьма надежную систему регуляции. Стохастичность первого шага дифференцировки обеспечивает нечувствительность стволовых клеток к запросу. Это их свойство очень важно. Оно лежит в основе того, что даже при очень высокой потребности в кроветворении после экстремальных воздействий стволовые клетки оказываются предохраненными от «самоубийственной» дифференцировки, от полного расходования на образование зрелых клеток. Стохастический и стабильный характер этого шага делает практически невозможным истощение отдела. В то же время вторая стадия дифференцировки возможна только в следующем отделе. Именно поэтому для подобной регуляции характерны универсальность, дальное действие, одновременный захват всей кроветворной системы с помощью циркулирующих стойких гормонов, а не локально активных, способных только к микродиффузии индукторов пролиферации стволовых клеток. Действительно, ведь мишенью для действия гормонов служат неспособные к длительному самоподдержанию клетки коммитированного отдела, истощение которых гормоном не опасно (отдел пополнится за счет стохастически образующихся из стволовых клеток предшественников, а число их быстро восстановится под влиянием самого индуктора).

В целом регуляция кроветворения представляет собой сложный процесс, в основе которого лежат кооперативные взаимодействия кроветворных клеток с их микроокружением, создаваемым стромальными клетками кроветворных органов. Оба этих отдела кроветворной системы построены, видимо, по одинаковому фундаментальному закону. Они содержат самоподдерживающиеся элементы, которые обеспечивают стабильное поддержание системы на оптимальном уровне в состоянии динамического равновесия. Ответ же на возмущающие воздействия обеспечивается несамоподдерживающимися элементами, чувствительными к индукторам, вероятно, гормональной природы. Прекращение действия индуктора автоматически возвращает систему на стабильный уровень в силу неспособности индуцибельных клеток (стромальных, эритропоэтинчувствительных и т. д.) к сколько-нибудь длительному самоподдержанию. Из этого следует, что основной принцип физиологической регуляции кроветворения, вернее, его количественной регуляции заключается в использовании индукторов (стимуляторов) той или иной дифференцировки; ингибиторы кроветворения, если они и существуют, могут играть только подсобную роль.

Литература

- Чертков И. Л. Родоначальная клетка кроветворной системы.— В кн.: Нормальное кроветворение и его регуляция. М., «Медицина», 1976, с. 40—97.
- Чертков И. Л. Регуляция стволовых кроветворных клеток.— Пробл. гематол., 1976, № 5, с. 3—8.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. М., «Медицина», 1977.
- Чертков И. Л., Леменева Л. Н., Менделевич О. А. Влияние антилимфоцитарной сыворотки на регуляцию кроветворения.— Пробл. гематол., 1972, № 1, с. 3—14.
- Axelrad A. A., McLeod D. L., Shreeve M. M., Heath D. A. Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro.— In: Hemopoiesis in culture. Robinson W. A. (Ed.). Washington, U. S. Government Print. Office, 1974, p. 226—234.
- Balner H. Bone marrow transplantation after whole body irradiation. Amsterdam, Radiobiol. Inst., 1963.
- Barnes D. W. H., Breckon G., Ford C. E. a. Fate of lymphoid cells injected into lethally irradiated mice: further experiments.— In: The lymphocyte in immunology. London, Ch. Thomas, 1967, p. 207—215.
- Barnes D. W. H., Ford C. E., Gray S. M., Loutit J. F. Spontaneous and induced changes in cell populations in heavily irradiated mice.— Progr. Nucl. Energy, VI, 1959, 2, p. 1—18.
- Becker A. J., McCulloch E. A., Siminovitch L., Till J. E. The effect of differing demands for blood cell production on DNA synthesis by hemopoietic colony-forming cells of mice.— Blood, 1965, 26, p. 296—308.
- Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.— Nature, 1963, 197, p. 452—454.
- Bond V. P., Flidner T. M., Archambeau A. Mammalian radiation lethality. New York.— London, Acad. Press, 1965.
- Bowden D. H., Adamson I. The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage.— Amer. J. Pathol., 1972, 68, p. 521—528.
- Bryant B. J., Cole L. J. Evidence for pluripotentiality of marrow stem cells: modification of tissue distribution of in vivo ^{125}I -UdR labelled transplanted marrow.— In: The lymphocyte in immunology. London, Ch. Thomas, 1967, p. 170—182.
- Chertkov I. L., Lemeneva L. N., Mendelevitch O. A. [Чертков И. Л., Леменева Л. Н., Менделевич О. А.]. Evaluation of factors effective in the determination of the transplanted fraction of colony-forming cells.— Folia. biol., 1972, 18, p. 277—283.
- Davis S. Hypothesis: differentiation of the human lymphoid system based on cell surface markers.— Blood, 1975, 45, p. 871—880.
- Dunn C. D. R. Haemopoietic stem cell.— Ser. Haematol., 1971, 4, p. 3—71.
- Edwards G. E., Miller R. G., Phillips R. A. Differentiation of rosette-forming cells from myeloid stem cells.— J. Immunol., 1970, 105, p. 719—729.
- El-Arini M. O., Osoba D. Differentiation of thymus-derived cells from precursors in mouse bone marrow.— J. Exptl Med., 1973, 137, p. 821—837.
- Ford C. E., Evans E. P., Gardner R. L. Marker chromosome analysis of two mouse chimeras.— J. Embryol. Exptl Morphol., 1975, 33, p. 447—457.
- Ford C. E., Micklem H. S., Evans E. P. e. a. The inflow of bone marrow cells in the thymus: studies with parabody irradiated mice injected with chromosome-marked bone marrow and subjected to antigenic stimulation.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, 129, p. 283—296.
- Godleski J. J., Brain J. D. The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras.— J. Exptl Med., 1972, 136, p. 630—643.
- Goldschneider I. Antigenic relationship between bone marrow lymphocytes, cortical thymocytes and a subpopulation of peripheral T cells in the rat: description of a bone marrow lymphocyte antigen.— Cell Immunol., 1976, 24, p. 289—307.
- Gregory C. J., McCulloch E. A., Till J. E. Erythropoietic progenitors capable of colony formation in culture: state of differentiation.— J. Cell. Physiol., 1973, 81, p. 411—420.
- Gregory C. J., McCulloch E. A., Till J. E. Transient erythropoietic spleen colonies: effects of erythropoietin in normal and genetically anemic W/W^v mice.— J. Cell. Physiol., 1975, 86, p. 1—8.
- Haas R. J., Meyer-Hamme K., Flidner T. M. The role of transplanted slowly proliferating bone marrow cells for regeneration of lethally X-irradiated rat bone marrow.— Scand. J. Haematol., 1972, 9, p. 121—129.
- Harrison D. E. Normal production of erythrocytes by mouse marrow continuous for 73 months.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1973, 70, p. 3184—3188.

- Harrison D. E., Astle C. M. Population of lymphoid tissues in cured W-anemic mice by donor cells.—Transplantation, 1976, 22, p. 42—46.
- Haskill J. S. Two-dimensional separation of embryonic and adult colony forming units. A study of differentiation in hemopoiesis.—Proc. Soc. Exptl Biol. and Med., 1971, 138, p. 60—65.
- Hendry J. H. The f number of primary transplanted splenic colony-forming cells.—Cell Tissue Kinet., 1971, 4, p. 217—223.
- Hodgson G. S., Bradley T. R., Martin R. F. e. a. Recovery of proliferating haemopoietic progenitor cells after killing by hydroxyurea.—Cell Tissue Kinet., 1975, 8, p. 51—60.
- Iscove N. N., Sieber F. Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture.—Exptl Hematol., 1975, 3, p. 32—43.
- Kubaneck B., Rencricca N., Porcellini A. e. a. The pattern of recovery of erythropoiesis in heavily irradiated mice receiving transplants of fetal liver.—Proc. Soc. Exptl Biol., 1969, 131, p. 831—834.
- Kubaneck B., Rencricca N., Porcellini A. e. a. The pattern of stem cell repopulation in heavily irradiated mice receiving transplants of fetal liver.—Blood, 1970, 35, p. 64—67.
- Lafleur L., Miller R. G., Phillips R. A. Restriction of specificity in the precursors of bone marrow-associated lymphocytes.—J. Exptl Med., 1973, 137, p. 954—966.
- Lahiri S. K., Keizer H. J., Puffen L. M. The efficiency of the assay for haemopoietic colony forming cells.—Cell Tissue Kinet., 1970, 3, p. 355—362.
- Latsinik N. V., Samoylina N. L., Chertkov I. L. [Лациник Н. В., Самойлина Н. Л., Чертков И. Л.]. Susceptibility to polycythemia of hemopoietic spleen colonies produced by embryonal liver cells.—J. Cell. Physiol., 1971, 78, p. 405—410.
- Lewis J. P., Trobaugh F. E. Haemopoietic stem cells.—Nature, 1964, 204, p. 589—590.
- Lubaroff D. M., Waksman B. H. Bone marrow as source of cells in reactions of cellular hypersensitivity.—J. Exptl Med., 1968, 128, p. 1425—1436.
- Luria E. A., Bakirov R. D., Yetiseyeva T. A. e. a. [Луря Е. А., Бакиров Р. Д., Елисеева Т. А.]. Differentiation of hepatic and hemopoietic cells and synthesis of blood serum proteins in organ cultures of the liver.—Exptl Cell Res., 1969, 54, p. 111—117.
- Luria E. A., Samoylina N. L., Gerasimov Yu. V., Chertkov I. L. [Луря Е. А., Самойлина Н. Л., Герасимов Ю. В., Чертков И. Л.]. Proliferation of hemopoietic stem cells in culture of embryonal liver of mice.—J. Cell. Physiol., 1971, 78, p. 461—463.
- Maloney M. A., Patt H. M. Migration of cells from shielded to irradiated marrow.—Blood, 1972, 39, p. 804—808.
- Matioli G., Merritt M., Vasudevan R. Hemopoietic stem cell growth and microdiffusion.—Math. Biosci., 1973, 17, p. 339—355.
- Matioli G., Vogel H., Niewisch H. The dilution factor of intravenously injected hemopoietic stem cells.—J. Cell. Physiol., 1968, 72, p. 229—234.
- Maximov A. A., [Максимов А. А.]. Der Lymphocyte als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und in postfoetalen Leben der Säugetiere.—Folia haematol., 1909, 8, p. 125—153.
- Mekori T., Chieco-Bianchi L., Feldman M. Production of clones of lymphoid cell populations.—Nature, 1965, 206, p. 367—368.
- Mekori T., Feldman M. Cytological study of hemopoietic spleen colonies.—Transplantation, 1965, 3, p. 98—113.
- Metcalf D., Moore M. A. S. Haemopoietic cells.—Amsterdam—London, North-Holland Publ., 1971.
- Metcalf D., Warner N. L., Nossal G. J. V. e. a. Growth of B lymphocyte colonies in vitro from mouse lymphoid organs.—Nature, 1975, 255, p. 630—632.
- Micklem H. S., Ford C. E., Evans E. P., Ogden D. A. Compartments and cell flows within the mouse haemopoietic system. I. Restricted interchange between haemopoietic sites.—Cell Tissue Kinet., 1975a, 8, p. 219—232.
- Micklem H. S., Ogden D. A., Evans E. P. e. a. II. Estimated rates of interchange.—Cell Tissue Kinet., 1975b, 8, p. 233—248.
- Miller R. G., Phillips R. A. Sedimentation analysis of the cells in mice required to initiate an in vivo immune response to sheep erythrocytes.—Proc. Soc. Exptl Biol., 1970, 135, p. 63—67.
- Mintz B., Palm J. Gene control of hematopoiesis.—J. Exptl Med., 1969, 129, p. 1013—1027.
- Moore M. A. S., Metcalf D. Ontogeny of the hemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo.—Brit. J. Haematol., 1970, 18, p. 279—296.
- Niewisch H., Hajdic I., Sultanian I. e. a. Hemopoietic stem cell distribution in tissues of fetal and newborn mice.—J. Cell. Physiol., 1970, 76, p. 107—116.
- Nossal G. J. V., Pike R. L. Studies on the differentiation of B lymphocyte in the mouse.—Immunology, 1973, 25, p. 33—45.
- Nowell P. C., Hirsch B. E., Fox D., Wilson D. B. Evidence for the existence of

- multipotential lympho-hematopoietic stem cells in the adult rat.—*J. Cell. Physiol.*, 1970, 75, p. 151—158.
- Ogden D. A., Micklem H. S. The fate of serially transplanted bone marrow cell populations from young and old donors.—*Transplantation*, 1976, 22, p. 287—293.
- Patton D. E., Kirk D. L., Moscona A. A. Hemopoiesis in embryonic mouse liver tissue and cells in vitro.—*Exptl Cell Res.*, 1969, 54, p. 181—186.
- Porteous D. D., Lajtha L. G. Restoration of stem cell function after irradiation.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1968, 149, p. 151—155.
- Pozzi L. V., Andreozzi U., Silini G. CFU in fetal spleen and peripheral blood.—*Acta haematol.*, 1972, 48, p. 337—346.
- Pozzi L. V., Silini G. Kinetics of multiplication and differentiation of haemopoietic progenitor cells transplanted into irradiated mice.—In: *Effects of radiation on cellular proliferation and differentiation*. Vienna, IAEA, 1968, p. 139—148.
- Rosendaal M., Hodgson G. S., Bradley T. R. Haemopoietic stem cells are organized for use on the basis of their generation-age.—*Nature*, 1976, 264, p. 68—69.
- Rozenszajn L. A., Shoham D., Kalechman I. Clonal proliferation of PHA-stimulated human lymphocytes in soft agar culture.—*Immunology*, 1975, 29, p. 1041—1055.
- Sachs L. Regulation of membrane changes, differentiation and malignancy in carcinogenesis.—In: *Harvey Lectures*, v. 68, N. Y., Acad. Press, 1974, p. 1—35.
- Schmalz F., Huber H., Asamer H. e. a. Cytochemical and immunohistologic investigations on the source and the functional changes of mononuclear cells in skin window exudates.—*Blood*, 1969, 34, p. 129—140.
- Schooley J. C. The effect of erythropoietin on the growth and development of spleen colony-forming cells.—*J. Cell. Physiol.*, 1966, 68, p. 249—262.
- Siminovitsh L., Till J. E., McCulloch E. A. Radiation response of hemopoietic colony-forming cells derived from different sources.—*Radiat. Res.*, 1965, 24, p. 482—493.
- Tepperman A. D., Curtis J. E., McCulloch E. A. Erythropoietic colonies in cultures of human marrow.—*Blood*, 1974, 44, p. 659—669.
- Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.—*Radiat. Res.*, 1961, 14, p. 213—222.
- Trentin J., Wolf N., Cheng V. e. a. Antibody production by mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors.—*J. Immunol.*, 1967, 98, p. 1326—1337.
- Tyan M. L. Fetal liver and adult thymus cells: absence of synergism in GvH reaction.—*Proc. Soc. Exptl Biol.*, 1969, 132, p. 1183—1185.
- Virolainen M., Defendi V. Ability of haematopoietic spleen colonies to form macrophages in vitro.—*Nature*, 1968, 217, p. 1069—1070.
- Wu A. M., Till J. E., Siminovitsh L., McCulloch E. A. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells.—*J. Cell. Physiol.*, 1967, 69, p. 177—184.
- Wu A. M., Till J. E., Siminovitsh L., McCulloch E. A. Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system.—*J. Exptl Med.*, 1968, 127, p. 455—464.
- Yutoku M., Grossberg A. L., Pressman D. The expression on mouse lymphoid cells of Th-B, and antigen common to mouse B cells and thymus cells.—*J. Immunol.*, 1975, 115, p. 69—74.

ДИНАМИКА АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ

V.1. КРИВАЯ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ

Очень многие вещества (антигены, иммуногены), попав в организм животного или человека, вызывают в нем цепь биохимических и клеточных процессов, одним из следствий которых является индукция (или резкое усиление) биосинтеза своеобразного белка — антитела. Особенность этого белка состоит в том, что он избирательно соединяется именно с тем веществом, которое индуцировало его появление.

Кривые нарастания содержания антител могут быть весьма различными в зависимости от химического состава и степени агрегированности иммуногенов, способа их введения животному и состояния организма, дозы иммуногена и сопутствующих веществ (адъювантов). Однако, как правило, в каждой кривой можно выявить участки, соответствующие следующим периодам: 1) латентной фазе, 2) фазе сначала быстрого, а затем все более замедляющегося нарастания содержания антител, заканчивающейся максимальным пиком, 3) фазе торможения антителообразования и падения их уровня.

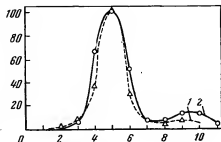
Во многих случаях содержание антител в течение некоторого времени нарастает экспоненциально, что было показано как иммунологическими методами (Burnet, Fenner, 1949), так и при помощи количественного иммунохимического метода (Гурвич, 1958). Например, в наших опытах после вторичной иммунизации кроликов альбумином лошади содержание антител против этого белка удваивалось так быстро, что через восемь суток содержание данного антитела стало бы равным общему количеству белков в организме кролика. В действительности этого, конечно, не происходило.

Сопоставляя данные об изменении количества антител и разведении в них изотопной метки, мы вычислили кривую изменения интенсивности синтеза изучаемого антитела после иммунизации (рис. 30). На этой кривой хорошо видно, что после достижения максимального пика антитело-

Рис. 30. Изменение числа АОК (1) и скорости синтеза антител (2) после иммунизации (Гурвич, 1958)

1 — мышь, иммунизированная эритроцитами барана;
2 — кролик, иммунизированный альбумином лошади.

По оси абсцисс — время после введения антигена, сут.; по оси ординат — интенсивность антителообразования или нарастания числа АОК, в % от максимального



образования происходит чрезвычайно сильное торможение биосинтеза антител: за двое суток интенсивность этого процесса падает в 30 раз. После того как Эрне и Нордин (Jerne, Nordin, 1963) разработали метод локального гемолиза, позволяющий выявить отдельные образующие антитела клетки (АОК), оказывалось, что кривые изменения содержания АОК часто полностью совпадали с описанной нами кривой изменения интенсивности биосинтеза антител. Благодаря удобству метода локального гемолиза определение кривой изменения числа АОК при различных способах иммунизации получило широчайшее распространение.

В дальнейшем мы попытаемся проанализировать некоторые процессы, протекающие как в фазе нарастания антителообразования, так и в фазе торможения этого процесса.

V.2. ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОГРАНИЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ

Иммуноглобулины, к которым относятся антитела, представляют большую группу белков, отдельные молекулы которых построены путем сочетания различных легких полипептидных цепей и различных тяжелых полипептидных цепей (см. Введение и раздел I). Изучение строения этих полипептидных цепей показало, что любую из них можно разбить на участки (домены), состоящие из 100—110 аминокислотных остатков (Незлин, 1972; Gally, Edelman, 1972). Каждая из полипептидных цепей иммуноглобулинов делится на две сильно различающиеся области: вариабельную (V) и константную (C). У человека существует несколько вариантов константных областей: три варианта для легких цепей (C_{λ} , $C_{\lambda \text{ arg}}$, $C_{\lambda \text{ ala}}$) и десять вариантов для тяжелых цепей ($C_{\mu 1}$, $C_{\mu 2}$, $C_{\mu 3}$, $C_{\mu 4}$, $C_{\mu 5}$, $C_{\mu 6}$, $C_{\mu 7}$, $C_{\mu 8}$, $C_{\mu 9}$, $C_{\mu 10}$).

Еще больше различаются между собой V-области, среди которых вообще не удастся обнаружить двух идентичных. Однако наличие сходных участков позволило объединить различные V-области в подгруппы, внутри каждой из которых сходство строения превышает 80%. У человека описано пять таких подгрупп, связанных с легкими цепями λ ($V_{\lambda I}$ — $V_{\lambda V}$), три подгруппы, связанные с легкими цепями κ ($V_{\kappa I}$ — $V_{\kappa III}$) и четыре подгруппы, связанные с тяжелыми цепями ($V_{\mu I}$ — $V_{\mu IV}$). Сочетанием этих V- и C-областей у людей образуется 10 вариантов легких цепей λ , три варианта легких цепей κ и 40 вариантов тяжелых цепей.

При сборке молекул иммуноглобулинов 13 вариантов легких цепей и 40 вариантов тяжелых цепей соединяются в различных сочетаниях, образуя в организме человека более 500 вариантов молекул иммуноглобулинов (рис. 31). На самом деле число присутствующих в крови человека молекул иммуноглобулинов значительно больше. Во-первых, большинство полипептидных цепей присутствует в виде двух вариантов (аллотипов), каждый из которых контролируется одним из аллельных генов. Во-вторых, на все это накладывается гетерогениость, связанная с наличием у отдельных молекул активности антитела. Активность антитела данной специфичности может быть связана с молекулами, различающимися не только по константным областям, но даже и по строению вариабельной области. И, наоборот, молекулы, относящиеся к одному варианту, как по константной области, так и по подгруппе вариабельной области могут различаться между собой по специфичности.

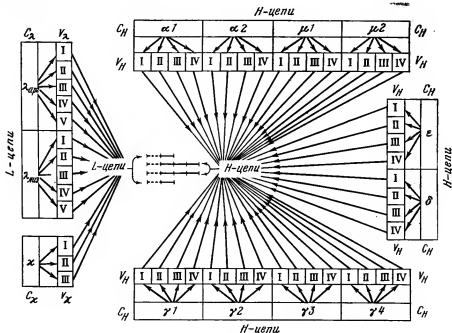


Рис. 31. Образование большого семейства молекул иммуноглобулинов путем сочетания различных полипептидных цепей, каждая из которых содержит в разных комбинациях разные варибельные (V) и константные (C) области

Следовательно, в организме человека и животных одновременно синтезируются сотни вариантов молекул иммуноглобулинов и антител. Впервые Бернет (Burnet, 1957) высказал весьма плодотворную идею о том, что, хотя в организме животного или человека синтезируется одновременно много различающихся по специфичности антител, в одной клетке (клоне клеток) синтезируется лишь антитело одной специфичности. Логическим развитием этой идеи, связанной с появлением данных о существовании многих вариантов иммуноглобулинов и большого набора генов, контролирующих их строение, явились представления о фенотипическом ограничении активности основной массы этих генов, в результате чего одна клетка (клон клеток) синтезирует лишь один вариант молекул иммуноглобулинов (Бернет, 1971).

В настоящий момент накопился огромный материал, подтверждающий правильность этой точки зрения во многих случаях. Вместе с тем появились и данные, не позволяющие свести наблюдаемые факты к упрощенной формуле: один вариант иммуноглобулина — один клон клеток.

V.2.1. Аллельное исключение

В крови людей и животных, гетерозиготных в отношении генов, контролирующих строение иммуноглобулинов, обнаруживается продукт обоих аллельных генов (см. раздел II; Grubb, 1970). Аллельные детерминанты могут быть выявлены специфическими антисыворотками. Вопрос о том,

сохраняют ли активность в каждой из лимфатических клеток оба аллельных гена или только один из них, изучался многими исследователями.

Прежде всего были сделаны попытки выявить наличие продуктов аллельных генов на поверхности лимфоцитов, используя для этого иммуофлуоресцентный метод. Хотя первые опыты, выполненные этим методом, выявили на поверхности лимфоцитов продукт обоих аллельных генов (Colberg, Gray, 1964), последующие опыты, проведенные с большими предосторожностями, привели к обратному выводу (Fröland, Natvig, 1972).

Особенно четкие данные были получены после удаления иммуноглобулинов с поверхности лимфоцитов и изучения регенерировавших молекул. Так, среди лимфоцитов крови гетерозиготных кроликов генотипов b^5b^6 и b^4b^5 имеются клетки, на поверхности которых присутствует лишь один из аллельных вариантов легких цепей (b^5 на 5,5% и b^4 на 44,2% клеток). Довольно много (14%) клеток содержат на поверхности оба варианта легких цепей. После обработки лимфоцитов протеолитическим ферментом (трипаза) иммуноглобулины на поверхности клеток не обнаруживаются в течение некоторого времени. Через 13—24 часа иммуноглобулины на поверхности лимфоцитов регенерируют, но теперь оба варианта легких цепей имеются лишь на поверхности 2,2% клеток. Зато выявляются только b^4 - или только b^5 -цепи (на 63 и 15% клеток соответственно) (Jones *et al.*, 1973).

Эти результаты были подтверждены изучением лимфоцитов гетерозиготных кроликов (b^5b^6) при помощи специального аппарата, позволяющего расфракционировать лимфоциты на несущие один вариант или оба варианта легкой цепи (Jones *et al.*, 1974a). В пользу того, что на поверхности клеток локализован лишь один аллотип, говорят и ауторадиографические данные (Jones, Sebra, 1974).

Используя аллельноспецифические сыворотки для ингибции локального гемолиза, можно установить аллельные метки антител, образованных отдельными АОК. Оказалось, что, как правило, каждая АОК синтезирует антитела, относящиеся к одному аллельному варианту.

Необходимо, однако, указать на существование аргументов в пользу возможности присутствия на одной лимфатической клетке продуктов двух аллельных генов. Во-первых, на это указывают опыты по индукции трансформации лимфоцитов гетерозиготных кроликов при действии на лимфоциты аллельноспецифических антисывороток (Sell *et al.*, 1970). Во-вторых, на присутствие продуктов двух аллельных генов на одной В-клетке указывает серия обстоятельных опытов, в которых лимфоциты обрабатывали антителами против аллотипических меток, локализованных на их поверхности (например, анти- b^4 или анти- b^6). Затем изучали образование розеток между насыщенными антителами лимфоцитами и покрытыми одним или другим аллельным продуктом (b^4 или b^6) эритроцитами барана. Кроме того, в одну из групп эритроцитов барана вводили флуоресцирующую краску. Этим методом среди лимфоцитов гетерозиготного кролика выявлялись как клетки, несущие один из аллельных вариантов иммуноглобулинов, так и клетки, несущие оба варианта (в некоторых случаях их 50%, а в других от 10 до 30%). Специальные опыты показали, что обнаруживаемые на поверхности клеток иммуноглобулины синтезируются этими клетками, а не захватываются из окружающей клетки сыворотки. На это, в частности, указывают два факта:

1) после регенерации иммуноглобулинов, удаленных с поверхности проназой, число клеток, несущих два аллельных варианта, снова становится таким же (8—30%), каким оно было до обработки; 2) гетерозиготные крольчата могут отличаться от матери по аллельному варианту иммуноглобулина; на поверхности клеток материнский вариант иммуноглобулина отсутствует, хотя соответствующие молекулы матери в течение некоторого времени находятся в крови крольчат (Wolf e. a., 1971; Kimball, Wolf, 1976; Schoenberg, Wolf, 1976).

Приведенные данные показывают, что вопрос о существовании аллельного исключения полностью не решен, хотя наличие его признается подавляющим большинством исследователей. Здесь уместно напомнить, что при изучении других генов аллельное исключение было описано лишь в одном случае — для продукта X^a -гена, локализованного в X-хромосоме (Grubb, 1970).

Были сделаны попытки выяснить молекулярные механизмы аллельного исключения. Особый интерес имеют неподтвержденные данные об аллельном исключении на уровне трансляции. Согласно этим данным, в отдельных пробах бесклеточной системы, содержащей полисому гетерозиготных кроликов (b^+b^+), синтезировался либо один, либо другой из аллельных продуктов, но не оба сразу (Huff e. a., 1973).

V.2.2. Фенотипическое ограничение активности генов, контролирующих константную область тяжелых цепей

Использование флуоресцирующих антител показало, что часто на отдельных В-клетках обнаруживаются лишь иммуноглобулины одного класса и подкласса (Grubb, 1970; Fröland, Natvig, 1972; Jones, Cebra, 1974; Jones e. a., 1974). Однако как те же самые, так и другие исследователи при помощи сходных методов выявляли присутствие на поверхности одной клетки иммуноглобулинов (например, μ и γ или μ и δ), контролируемых разными C_H -генами. Значительная часть лимфоцитов периферической крови людей синтезирует одновременно IgM- и IgD-рецепторы (Rowe e. a., 1973).

В лимфатических органах наряду с клетками, синтезирующими лишь один иммуноглобулин, всегда присутствует немного клеток, каждая из которых синтезирует продукты двух или даже трех C_H -генов (Jones e. a., 1974).

Синтез одной клеткой продуктов различных C_H -генов наблюдался при изучении секреции антител одиночными клетками. Оказалось, что наряду с клетками, секретирующими антитела только IgM или только IgD, существуют и клетки (1,5% от всех антителообразующих), которые одновременно секретируют оба эти антитела (Nossal e. a., 1971).

Антитела IgG₁ и IgM синтезировали одновременно 16% клонов АОК, образовавшихся в микрокультурах селезенок мыши (Klinman e. a., 1974).

Изучение синтеза иммуноглобулинов отдельными линиями нормальных и опухолевых В-клеток показало, что наряду с линиями, синтезирующими один C_H -продукт, существуют линии, синтезирующие продукты двух и даже трех C_H -генов (Tanigaki, 1966). Хотя приведенные факты указывают на возможность синтеза В-клеткой продуктов нескольких C_H -генов, на определенной стадии дифференцировки отдельные В-клетки обычно синтезируют лишь один из этих продуктов.

Многими авторами показано, что в процессе дифференцировки клон¹ В-клеток они переключаются с синтеза одного C_H -продукта на синтез другого (Preud'homme, Clauvel, 1975). По-видимому, первым иммуноглобулином, который начинает синтезироваться В-клетками является тяжелая цепь, входящая в IgM, IgD. Затем появляются клетки, синтезирующие как эту цепь (сигма), так и цепь, входящую в состав IgM (мю-цепь), и, наконец, клетки, синтезирующие все остальные варианты иммуноглобулинов.

V.2.3. Фенотипическое ограничение V-генов

Обнаружение антигенных детерминант, локализованных в V-областях полипептидных цепей (идиотипические детерминанты), сильно расширило возможность изучения экспрессии V-генов. Использование антител против идиотипических детерминантов, позволяющих идентифицировать V-области, в ряде случаев показало, что тяжелые цепи, синтезированные одной клеткой, могут различаться по C-области (например, быть гамма-и мю-цепями), но быть идентичными по V-области.

Так, на многих лимфоцитах присутствуют одновременно продукты C_H - и C_H -генов. Однако оба эти продукта идентичны по идиотипической специфичности, т. е. идентичны по V-области (Fu e. a., 1975).

Образование антифосфорилхоллиновых антител, относящихся к разным классам (IgA, IgM и IgG1), но идентичных по идиотипу, было показано у мышей (Gearhart e. a., 1975).

Особо убедительны опыты, в которых экспрессия как аллельных, так и неаллельных V-генов изучалась генетическими методами. В результате этих исследований было выявлено наличие V_H -гена, контролирующего у мышей C57BL/6 определенный идиотип (V_H НФ), обнаруживаемый в антителах против 4-окси-3-нитро-фенилуксусной кислоты (НФ). Этот ген отсутствует у мышей СВА. Если гибриды этих двух линий (C57BL/6 \times СВА)F₁ иммунизировать НФ, то отдельные особи образуют либо антитела, несущие изучаемый идиотип (92% особей), либо антитела, лишенные его (8% особей). Лишь очень немногие мыши синтезировали антитела, несущие продукт обоих аллельных V_H -генов (Julin e. a., 1976).

Еще более четко наличие жесткого фенотипического ограничения было доказано у кроликов. Генетический анализ показал, что у этих животных существует по меньшей мере три локуса (a, x, y), контролирующих основную структуру вариабельной области тяжелых цепей. У кроликов, гомозиготных по двум неаллельным генам (a^1 и y^{33}), иммунофлуоресцентным методом было изучено более 30 000 В-лимфоцитов. Ни на одном из них не удалось выявить одновременного присутствия продуктов обоих этих V-генов (Knigh, Pernis, 1975).

На более жесткое фенотипическое ограничение V_H -генов по сравнению с ограничением экспрессии C_H -генов указывает то, что в сыворотках некоторых больных обнаружены мнемонные белки, различающиеся по константным областям, но сходные по вариабельным. Так, в сыворотке одного больного присутствовало два моноклональных белка, относящихся к разным классам (IgA и IgM), но очень сходных по идиотипу. Иммунофлуоресцентный анализ лимфоцитов, извлеченных из костного мозга этого больного, показал, что изучаемые белки образуются в разных

клетках. По-видимому, клоны обонх типов клеток возникли из одной зародышевой клетки, у потомков которой ограничение проявления S_H -генов менее жестко, чем V_H -генов (Silverman e. a., 1973).

Другой подход к выяснению вопроса о фенотипическом ограничении действия V_H -генов основан на изучении возможности синтеза одним В-лимфоцитом нескольких различающихся по специфичности антител.

Согласно данным большинства исследователей, подавляющая часть АОК образует антитела лишь одной специфичности. Клетки, образующие одновременно два антитела, либо отсутствуют, либо присутствуют в ничтожном количестве. Так, у мышей, иммунизированных двумя видами эритроцитов, антитела против обоих эритроцитов не образовывала ни одна из 16 904 изученных АОК. Не удалось выявить двойных продуцентов ни в одном случае при изучении 27 845 АОК из лимфатических узлов кроликов, иммунизированных одновременно двумя гаптеинами (Gershon e. a., 1968). Сходные результаты при иммунизации животных смесью разных антигенов получили и другие исследователи.

Наличие небольшого числа двойных продуцентов признавали многие исследователи. Так, Носсел (1973) показал, что двойные продуценты составляют 0,01% от общего числа АОК. Появлявшееся время от времени сообщение о том, что двойные продуценты могут присутствовать в большом количестве (до 20% от общего числа АОК) (Attardi e. a., 1964), встречались большинством исследователей с недоверием и признавались затем неубедительными.

Лишь недавно появились две группы хорошо аргументированных опытов, указывающих на мультипотентность клеток, синтезирующих антитела. В качестве примера подобных опытов можно указать на работу, в которой *in vitro* суспензию клеток селезенки мышей иммунизировали комплексом эритроцитов с гаптенем (ТНФ — эритроциты барана). При этом образовывалось три типа АОК: 1) синтезирующие антиэритроциты барана, 2) синтезирующие анти-ТНФ и 3) синтезирующие антитела обоих типов. Число двойных продуцентов было невелико (в 50—100 раз меньше, чем число АОК, образующих одно антитело). Однако наличие 2—30 двойных продуцентов на $1 \cdot 10^6$ клеток селезенки не вызывало сомнения. Отдельные АОК переносили в микрокультуры и определяли специфичность антител, образуемых как ими самими, так и их потомками. Оказалось, что часть дочерних клеток продолжала образовывать антитела той же специфичности, что и материнские. В противоположность этому специфичность многих дочерних клеток отличалась от исходной: потомки двойных продуцентов синтезировали лишь одно антитело, потомки клеток, синтезировавших антиэритроциты барана, начали синтезировать анти-ТНФ, и наоборот (табл. 9) (Couderec e. a., 1975a, b; Liacopoulos e. a., 1976).

Авторы второй группы работ обнаружили в селезенках мышей, иммунизированных двумя неродственными антигенами, клетки, образующие антитела против обонх антигенов (например, против эритроцитов барана и эритроцитов свиньи, или эритроцитов барана и эритроцитов лошади). Помещенные в микрокультуры потомки АОК таких животных в некоторых случаях изменяли специфичность синтезируемых антител. Такое изменение наблюдалось у 10 из 911 изученных дочерних клеток (Cunningham, 1976; Cunningham, Fordham, 1974).

Таблица 9

Изменение специфичности синтезируемых антител при развитии клона АОК в микрокультурах (Liaporoulos e. a., 1976, модифицировано)

Исходные АОК			Дочерние АОК	
Специфичность синтезируемых антител	Число помещенных в культуру	Число давших потомство	Специфичность синтезируемых антител	Число синтезирующих антитела
Анти-ЭБ	114	32	Анти-ЭБ	66
			Анти-ТНФ	28
			Анти-ЭБ + анти-ТНФ	5
Анти-ТНФ	101	29	Анти-ЭБ	47
			Анти-ТНФ	26
			Анти-ЭБ + анти-ТНФ	3
Анти-ЭБ + анти-ТНФ	71	19	Анти-ЭБ	17
			Анти-ТНФ	13
			Анти-ЭБ + анти-ТНФ	3

Примечание. ТНФ—триптерофенол; ЭБ—эритроциты барана.

V.3. ИСХОДНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ АНТИТЕЛООБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК У НЕИММУНИЗИРОВАННОГО ЖИВОТНОГО

В настоящий момент нет единого мнения по вопросу о том, как в организме взрослого животного могут образоваться клетки, синтезирующие огромный набор различающихся по специфичности и строению антител. Независимо от точки зрения, которой придерживается исследователь, он должен ожидать, что популяции В-лимфоцитов (к которой относятся как АОК, так и их предшественники) присуща значительная мозаичность. Эта мозаичность может отражать различие соматических процессов (мутаций, перестановок или перегруппировок генетического материала) в отдельных лимфатических клетках, приводящих к возникновению различных генов, необходимых для синтеза того или иного антитела. Она может быть связана с малой вероятностью сочетания ряда биохимических процессов, необходимых для того, чтобы антиген оказал влияние на белковый синтез в лимфатической клетке. И, наконец, мозаичность исходной популяции В-лимфоцитов может быть обусловлена тем, что хотя в любом из этих лимфоцитов присутствует набор генов, способных контролировать строение всех антител, но в каждом отдельном лимфоците активен лишь один из них.

Большинство исследователей предполагает, что клетки каждого отдельного элемента этой мозаики являются потомками одной клетки, т. е. составляют клоны клеток. Особый импульс изучению этого вопроса был дан появлением клональной теории Бернета (Burnet, 1957; Бернет, 1971), согласно которой эта мозаичность возникает до и независимо от действия антигена.

В настоящий момент используют ряд подходов для доказательства того, что в популяции В-лимфоцитов еще до попадания в организм антигена присутствуют клетки, преддетерминированные для превращения в

АОК, синтезирующие определенное антитело (предшественники АОК — ПАОК).

В первую очередь для этого используют так называемое радиоактивное убийство (Ada, Burt, 1969). С целью «убийства» ПАОК суспензию клеток селезенки неиммунизированных мышей обрабатывали антигеном (например, полимеризованным флагеллином), сильно меченым радиоактивным изотопом (например, ^{125}I). Оказалось, что суспензия клеток, обработанных таким образом, становится неспособной образовывать в дальнейшем антитела против антигена, использовавшегося для убийства, но образовывала антитела против других антигенов (Ada, Burt, 1969; Willcox e. a., 1975). Эти опыты наглядно указывают на существование еще до иммунизации специфических предшественников АОК и на возможность их избирательного удаления. Необходимо, однако, учитывать, что подавление антителиобразования в подобных опытах обычно неоплодотворительно.

Второе доказательство преддетерминированности основано на том, что удаление из суспензии лимфатических органов неиммунизированных животных клеток, специфически реагирующих с определенными антигенами, ослабляет образование ими антител к этим антигенам при последующей иммунизации.

Особенно эффективно использование для этой цели антигенов, иммобилизованных на нерастворимой основе (Wigzell, Anderson, 1969). При помощи этих соединений (иммуносорбентов) из суспензии селезенки неиммунизированных животных были извлечены клетки, реагирующие со многими антигенами: сывороточными альбуминами человека и быка, яичным альбумином, динитрофенолом, нитрофенолом, β -лактозидом и другими веществами (Wigzell, Anderson, 1971; Wofsy e. a., 1971).

Присоединившиеся к иммуносорбенту клетки можно извлечь тем или иным способом. Например, если в качестве основы для иммуносорбента используется желатина, то сорбент можно растопить и удалить при 30—37° С без повреждения клеток (Rutishauser e. a., 1973). Остатки этого сорбента можно убрать коллагеназой (Haas, Layton, 1975). В некоторых случаях более 90% извлеченных клеток были В-лимфоцитами.

На специфичность присоединения клеток указывает то, что оно резко снижается при наличии в среде избытка соответствующего антигена в растворимой форме. При оценке подобных опытов следует учитывать, что к иммуносорбенту присоединяется неожиданно большое (до 0,5% клеток селезенки неиммунизированного животного) количество клеток.

В популяции клеток, извлеченных описанным образом, определялось число АОК, специфичных к иммобилизованному антигену. Оказалось, что их число может быть в 100 или даже в 300 раз больше, чем в нефракционированной суспензии (Haas, 1975). Однако на этот расчет может оказать влияние целый ряд трудноучитываемых моментов: освобождение при описанной процедуре от супрессорных Т-клеток, контакт В-клеток как с иммобилизованным антигеном, так и со следами этого же антигена, перешедшего в раствор.

Разными методами проводилось определение минимальной величины популяции лимфатических клеток неиммунизированного животного, в которой еще возможно вызвать антителиобразование при иммунизации соответствующим антигеном. Предполагается, что в этой популяции содержится по крайней мере один предшественник АОК (ПАОК). (Если

для образования антител требуется более чем одна В-клетка, то содержится одна реагирующая единица.) Способность реагировать на соответствующий антиген испытывалась либо после перенесения изучаемой популяции клеток сингеничному облученному животному, либо после культивирования ее *in vitro*.

При помощи таких исследований было показано, например, что в селезенках неиммунизированных мышей (гибриды C57BL/6×DBA/2) на $0,86 \cdot 10^6$ клеток присутствует один ПАОК для антител против ТНФ и на $0,42 \cdot 10^6$ клеток присутствует один ПАОК для антител против эритроцитов барана (Kettman, Dutton, 1975). Следовательно, в селезенке мыши, содержащей примерно $70 \cdot 10^6$ лимфатических клеток, до иммунизации присутствует соответственно 60 и 30 клеток-предшественников для АОК, образующих антитела против ТНФ и эритроцитов барана.

Эти данные хорошо согласуются с представлением: одна клетка-предшественник — одно антитело, даже если признать существование относительно большого количества различающихся по специфичности антител. Значительно сложнее согласовать с этими представлениями данные, полученные при изучении образования антител у головастиков жабы. В селезенках этих головастиков содержится всего лишь 6000—12 000 лимфоцитов, а во всем их организме — $2 \cdot 10^5$ лимфатических клеток. Несмотря на это, головастики образовывали специфические антитела против эритроцитов барана и человека (Du Pasquier, 1970), а также против ДНФ и ТНФ (Haimovich, Du Pasquier, 1973).

Еще труднее согласовать с этими представлениями данные, полученные при предварительной стимуляции митогеном культивируемых лимфоцитов. Последующее определение ПАОК в этих культурах выявило неожиданно большое их число на 10^6 лимфоцитов для эритроцитов барана (435), для комплекса ТНФ — эритроциты барана (20 000) и для комплекса НИФ — эритроциты барана (100 000) (Andersson *et al.*, 1977).

По-видимому, в организме животных и человека присутствуют фоновые клетки, образующие антитела против самых разнообразных антигенов. В крови постоянно обнаруживаются в ничтожных количествах так называемые натуральные антитела против различных бактерий, вирусов, эритроцитарных и клеточных антигенов, гаптеинов и других веществ (см. Boyden, 1966; Mäkelä, Yormalainen, 1974).

Натуральные антитела против некоторых антигенов присутствуют даже в крови безмикробных животных. Однако не у каждого животного или человека удается выявить натуральные антитела против любого антигена. Например, даже очень чувствительным методом и в одной из 28 сывороток неиммунизированных кроликов не обнаруживались антитела против лизоцима и лишь в одной из этих сывороток найдены антитела к ДНФ и пенициллину (Haimovich *et al.*, 1970).

Таким образом, можно заключить, что еще до первого введения антигена извне популяция лимфатических В-клеток сильно мозаична. В ней присутствует много В-клеток, способных реагировать с введенным антигеном (до 0,1—1% всех клеток), и небольшое число (по несколько на $1 \cdot 10^6$ клеток) В-клеток, способных дифференцироваться в активно развивающийся клон АОК, образующих антитела против введенного антигена. Кроме того, в организме присутствует немного фоновых клеток, образующих антитела против разных антигенов.

V.4. АКТИВАЦИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ АНТИГЕНАМИ И МИТОГЕНАМИ

Активация В-лимфоцитов связана с рядом специфических и неспецифических стимулов, которые приводят к глубоким биохимическим и морфологическим изменениям в этих клетках.

Существуют теории, пытающиеся объяснить, каким образом антиген «запускает», активирует В-клетки. Хотя действие антигена и является наиболее важным для активации В-клеток, в процессе активации принимают участие и дополнительные факторы: 1) антигенспецифические Т-клетки, 2) медиаторы, секретируемые антигенспецифическими Т-клетками, 3) медиаторы, секретируемые неспецифическими Т-клетками, 4) продукт Ia-гена, 5) добавочные клетки (макрофаги, А-клетки), 6) антигенспецифические Т-супрессоры (Barton, Diner, 1975; Talmage, Thomas, 1975; см. также разделы VII.1.3 и IX.2).

В настоящий момент предложен ряд моделей, объясняющих активацию В-лимфоцитов. Остановимся на некоторых из них (см. также раздел VII.1.).

1. Активация В-клеток обусловлена внедрением липофильного блока в двойной липидный слой их мембраны. Это внедрение может происходить и без участия антигена, неспецифически, при большой концентрации соответствующего метаболита. Таким образом, например, действует, по-видимому, неспецифический стимулирующий фактор Т-клеток-помощников.

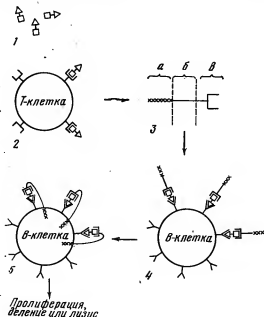
Специфичность иммунологического процесса обусловлена наличием медиатора, который секретируется Т-лимфоцитами под влиянием антигена. Этот медиатор (секретируемый рецептор Т-клеток) состоит из трех частей: рецептора Т-клеток, специфически реагирующего с детерминантами несущей части антигена (носителя), H-2-белка и «липофильного хвоста» (рис. 32). Медиатор присоединяется своим рецептором к антигену, фиксированному на поверхности антигенсвязывающей клетки, и липофильный хвост внедряется в фосфолипидный слой мембраны (Barton, Diner, 1975).

2. Присоединение антигена к В-лимфоциту приводит к его обратному параличу или неактивации благодаря возникновению сигнала 1. Сигнал 1 развивается при бимолекулярной реакции между одновалентным антигеном и соответствующим рецептором В-клетки. Он чрезвычайно быстро (возможно, уже через секунду) оказывает на клетку парализующее действие. Индукция иммунной реакции возникает в том случае, если на В-клетку после сигнала 1 действует еще и сигнал 2. Первоначально предполагалось, что сигнал 2 вызывают антитела, которые фиксированы на поверхности Т-клеток и специфичны для антигена, присоединившегося к В-лимфоцитам. В дальнейшем была допущена возможность передачи сигнала 2 на небольшое расстояние при помощи образуемого Т-лимфоцитами медиатора. В некоторых случаях сигнал 2 обусловлен действием антител не против антигенов, присоединившихся к поверхности В-лимфоцитов, а против собственных антигенов его поверхности (Bretscher, Cohn, 1970; Bretscher, 1975).

3. Для активации В-лимфоцитов необходим второй сигнал. Этот сигнал исходит от присоединившегося к клетке С3-компонента комплекса. В пользу этого взгляда говорят наличие на поверхности ПАОК рецеп-

Рис. 32. Схема активации В-клеток путем встраивания в липидную мембрану «липофильного хвоста» (Barton, Diener, 1975)

- 1 — молекулы антигена;
- 2 — антигенсвязывающая Т-клетка, присоединившая антиген;
- 3 — молекула рецептора Т-клетки, состоящая из трех частей: липофильного хвоста (а), Н-белка (б), носителя участка, специфически присоединяющего антиген (в);
- 4 — В-клетка, связывающая антиген и молекулу рецептора Т-клетки;
- 5 — внедрение липофильного хвоста в липидную мембрану В-клетки



торов для активизированного СЗ-компонента и митогенность очищенных препаратов СЗ-компонента. Соответствует этой точке зрения и наличие в лимфатических клетках липосомальных протеаз, активирующих СЗ-компонент, и то, что эти протеазы выделяются как при действии на лимфатические клетки антигенов и иммуногенов, так и при взаимодействии Т- и В-лимфоцитов (Dukor, Hartman, 1973; Hartman, 1975).

В связи с этой точкой зрения нельзя не упомянуть о митогенном действии протеаз. Действие на клетки селезенки трипсина стимулирует включение ³Н-тимидина в эти клетки почти так же сильно, как действие самых мощных митогенов. Действие трипсина направлено на В-клетки: более 80% трансформированных им клеток содержало на поверхности иммуноглобулины; он чрезвычайно сильно стимулирует включение ³Н-тимидина в клетки селезенки бестимусных мышей (Kaplan, Bona, 1974; Vischer, 1974).

4. По модели одного неспецифического сигнала присоединение антигена к иммуноглобулиновым рецепторам В-лимфоцитов индуцирует ряд процессов (например, образование «колпачка»), но не активирует эти клетки. В-лимфоциты активируются неспецифическим сигналом от участка на их поверхности, который не является иммуноглобулином. Эти сигналы исходят от самого антигена (но не от их антигенной детерминанты) в случае тимуснезависимых антигенов и от медиаторов Т-клеток или макрофагов (в случае тимусзависимых антигенов).

Результаты активации зависят исключительно от того, какие клетки способны в это время к активации, и от уровня дифференцировки клеток. Имеют значение частота митозов и продолжительность митотического цикла, уровень секреции антител и их класс, а также многое другое. Хотя иммуноглобулиновые рецепторы В-клеток и не участвуют прямо в генерации активирующего сигнала, они ответственны за специфичность иммунной реакции: избирательное присоединение к определенным В-клет-

кам антигена, содержащего в своей молекуле неспецифические митогенные детерминанты, способствует избирательной полиферации этих клеток (Coutinho, 1975; Möller, 1975).

V.5. ИЗМЕНЕНИЕ В-КЛЕТОК ПОСЛЕ АКТИВАЦИИ

Первым следствием действия антигена на В-клетки является перемещение иммуноглобулиновых рецепторов на их поверхности. В результате такого перемещения иммуноглобулиновые рецепторы, рассеянные более или менее равномерно на поверхности клеток, агрегируются, образуя «колпачки», или скопления (Vitteta, Uhr, 1975). Вслед за этим начинаются морфологические изменения (Фриденштейн, Чертков, 1969; Бернет, 1971). Необходимо, однако, учитывать, что эти изменения, очевидно, не связаны прямо со способностью клеток образовывать антитела. Использование световой и сканирующей электронной микроскопии для изучения морфологии АОК, выявляемых методом локального гемолиза, показало, что антитело могут образовывать В-лимфоциты самой различной формы. Так, например, через четыре дня после иммунизации мышей BALB/c эритроцитами барана в их селезенке было найдено восемь различающихся по морфологии типов АОК: плазмобласты (3%), плазматические клетки (10%), малые лимфоциты (38%), средние лимфоциты (16%), большие лимфоциты (9%), лимфобласты (10%), клетки с эксцентрическими темными или сегментированными ядрами (9%) и, наконец, двухъядерные клетки (5%). Наиболее активно синтезировали антитела двухъядерные клетки (Thorntwaite, Leif, 1974).

Активация лимфатических клеток приводит к изменениям буквально всех звеньев биохимического обмена в этих клетках. В первую очередь изменяется транспорт ионов (K^+ , Na^+ , Ca^{++}), аминокислот, углеводов и нуклеозидов через поверхностную мембрану лимфатических клеток. В мембране изменяется обмен белков, липидов и углеводов (Wedner, Parker, 1976), уменьшается число конечных остатков сиаловой кислоты (Anteunis, 1974), и, наоборот, резко увеличивается (в 11 раз) число молекул трансплантационных антигенов (McCune *et al.*, 1975). Имеется много литературных данных по изменению обмена белков, углеводов, РНК и ДНК в цитоплазме и ядре лимфатических клеток после их активации (например, Wedner, Parker, 1976).

В последние годы особое значение придают происходящим при активации изменениям обмена циклических 3',5'-нуклеозид монофосфатов: циклического 3',5'-адеозинмонофосфата (цАМФ) и циклического 3',5'-гуаузинмонофосфата (цГМФ). Эти соединения регулируют многие биохимические процессы путем активации различных протеинкиназ. Во многих случаях цАМФ и цГМФ выступают как антагонисты. Они привлекали внимание исследователей, изучающих активацию В-лимфоцитов, по двум причинам. Во-первых, ряд фактов указывает на то, что они (в первую очередь цАМФ) играют важную роль в регуляции клеточного деления (см., например, Scheppard, 1974; Anderson, Pastan, 1975; Mac Manus *et al.*, 1975). Во-вторых, оказалось, что через систему циклических 3',5'-нуклеозидмонофосфатов можно оказать глубокое влияние на внутриклеточный обмен без проникновения внутрь клетки, воздействуя на ее рецепторы. В частности, таким образом действуют многие гормоны (Юдаев и др., 1975).

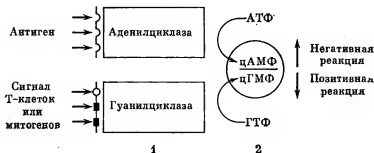


Рис. 33. Схема изменения в В-клетках соотношения между цАМФ и цГМФ при действии на эти клетки антигенов и митогенов

1 — мембрана; 2 — цитоплазма

Содержание цАМФ и цГМФ в клетках в значительной мере определяется соотношением между активностью аденилциклазы и гуанилциклазы (катализирующих их образование из АТФ и ГТФ), с одной стороны, и активностью фосфодиэстераз, катализирующих их распад, — с другой. Гормоны, соединяясь с рецепторами поверхности клеток, активируют эти ферменты, фиксированные в клеточных мембранах. Это приводит к изменению внутри клеток как соотношения, так и уровня цАМФ и цГМФ и изменяет ход ряда внутриклеточных биохимических процессов (Chandra e. a., 1974). Было заманчиво предположить, что именно таким образом антигены и митогены, присоединившись к рецепторам поверхности В-лимфоцитов, «запускают» в них цепь биохимических процессов, приводящих к дифференцировке и пролиферации.

Изучение этого вопроса проводилось в нескольких направлениях. На основании многих фактов Уотсон (Watson, 1975a, b) предлагает схему, представленную на рис. 33. Согласно этой схеме, антиген, реагируя с иммуноглобулиновыми рецепторами мембраны, активирует аденилциклазу, увеличивает синтез цАМФ и изменяет в ее пользу соотношение цАМФ/цГМФ. Это сдвигает биохимические процессы в сторону негативной реакции. В отличие от антигена сигнал Т-клеток и митогены, действуя на мембрану клеток, активируют гуанилциклазу и сдвигают соотношение цАМФ/цГМФ в пользу цГМФ. Это направляет биохимические процессы в сторону позитивной иммунной реакции, связанной с пролиферацией и дифференциацией соответствующих клеток.

В пользу этой схемы говорят следующие данные. 1. Добавление митогенов как В-клеток (Watson, 1975a), так и Т-клеток (Hadden e. a., 1972, 1976) вызывает быстрое (за 15—30 мин) и резкое (в 5—50 раз) увеличение содержания цГМФ без значительного изменения уровня цАМФ (De Rubertis e. a., 1974). 2. Основная масса (свыше 90%, по данным Watson, 1975a) аденилциклазы и гуанилциклазы фиксирована в лимфоцитах на их клеточных мембранах. Митогены могут активировать эти ферменты (Watson, 1975b; Smith e. a., 1971). 3. Отношение цАМФ/цГМФ в медленно пролиферирующих культурах значительно выше, чем в быстро пролиферирующих. Так, оно в клетках селезенки бестимусных мышей после стимуляции митогеном липополисахаридом падало с 9,2 до 3,1 (Watson, 1975b). 4. Добавление цГМФ к клеткам селезенки бести-

мусных мышей вызвало резкое усиление синтеза ДНК. Ауторадиографически тимидиновая метка обнаруживалась после стимуляции в 10% клеток суспензии селезенки (вместо 1% в контроле). В противоположность этому действие цАМФ тормозило синтез ДНК (Webb e. a., 1975; Watson, 1975b). Такое же действие оказывали вещества (например, токсины холеры, простагландины, теофиллин), повышавшие эндогенный уровень цАМФ вследствие активации аденилциклазы или ингибции цАМФ-фосфодиэстеразы (De Rubertis, 1974).

В пользу значения изменения содержания цАМФ для развития антителиобразования указывают опыты, в которых изучалось это изменение после иммунизации мышей эритроцитами барана. Уровень цАМФ в клетках селезенки сразу же (через 2 мин) после иммунизации резко (в 2—3 раза) увеличивался, но затем снижался на весь период наиболее интенсивной пролиферации АОК (Plescia e. a., 1975; Yamamoto, Webb, 1975). При действии митогенов на Т-клетки увеличение содержания цГМФ или цАМФ наблюдали многие исследователи (например, Hadden e. a., 1976).

Необходимо, однако, отметить, что как обсуждавшаяся схема, так и вообще изучение роли циклических 3',5'-монофосфатнуклеотидов сталкивается со многими трудностями. Во-первых, повышение внутриклеточного содержания цГМФ вызывают многие вещества, не обладающие митогенным действием. Во-вторых, в определенных условиях добавление цАМФ резко стимулирует синтез ДНК (Mac Manus e. a., 1975). В-третьих, популяция лимфатических клеток очень гетерогенна и опасно связывать изменения, выявленные при суммарном анализе популяции, с изменениями в изучаемом клоне АОК.

Гетерогенность популяции лимфатических клеток делает очень сложным и изучение действия на них извне добавленного цАМФ или соединений, повышающих его внутриклеточный уровень. Некоторые исследователи при этом наблюдали подавление антителиобразования (Chandra e. a., 1974; Watson, 1975a), а другие — стимуляцию (Ishizuka e. a., 1970; Winchurch, 1974). Кроме того, действие цАМФ и цГМФ может быть противоположным в зависимости от их концентраций (Webb e. a., 1973). И, наконец, имеются убедительные данные в пользу того, что участие цАМФ в регуляции клеточного цикла необязательно. На это указывает сохранение нормального клеточного цикла у мутантов мышиной лимфомы S49 несмотря на отсутствие у них зависимой от цАМФ протейкиназы. Добавление к этим клеткам даже большого количества цАМФ не ингибировало их пролиферацию (Coffino e. a., 1975). Несмотря на все эти трудности, изучение роли циклических 3',5'-нуклеотидов в активации В-лимфоцитов является весьма перспективным.

Активация В-клеток приводит к превращению предшественников АОК в антителиобразующие клетки и к началу их пролиферации. Прежде всего необходимо остановиться на вопросе о продолжительности генерации АОК. Она определялась несколькими методами: 1) по доле делящихся АОК, содержащих метку через различные промежутки времени после добавления радиоактивного тимидина; 2) по зависимости между интенсивностью гибели АОК и продолжительностью действия на них ядов, влияющих на клетки лишь в определенные стадии митотического цикла (например, оксимочевина, действующая в S-фазу).

Согласно мнению большинства исследователей, время генерации АОК как у мышей, так и у кроликов колеблется от 8 до 13 час, а продолжи-

тельность S-фазы — от 5 до 8 час (Sado, Makinodan, 1964; Rowley e. a., 1968; Tannenberг, Malaviya, 1968; Jaroslow, Ortiz-Ortiz, 1971).

Были сделаны попытки проследить изменение интенсивности синтеза антител и иммуноглобулинов на разных стадиях клеточного цикла лимфатических клеток. По-видимому, все исследователи наблюдали уменьшение синтеза иммуноглобулинов во время митоза. Данные об изменении интенсивности синтеза на разных стадиях цикла противоречивы. Одни исследователи наблюдали быстрое увеличение в несколько раз синтеза антител и иммуноглобулинов в течение G₁-фазы и первой половины S-фазы, затем снижение этих процессов (Takahashi e. a., 1969; Cowan, Milstein, 1972; Thomas, 1974; Thomas e. a., 1975). Другие же исследователи указывают на относительное постоянство синтеза иммуноглобулинов в течение межмитотического периода (Liberti, Baglioni, 1973). Возможно, что противоречия связаны с тем, что синтез иммуноглобулинов, их внутриклеточное накопление и их секретиция изменяются на протяжении митотического цикла несинхронно (Byers, Kidson, 1970). Митотический цикл В-лимфоцитов сопровождается и другими периодическими изменениями. Например, уровень цАМФ и активность аденилциклазы в G₁- и G₂-фазах повышается, а в М-фазе снижается (Millis e. a., 1974).

Принципиальное значение имеет вопрос о том, связаны ли с делением превращения клеток-предшественников, не образующих антитела, в клетки, их образующие, и обусловлено ли последующее нарастание числа АОК только делением клеток, уже образующих антитела. Согласно мнению большинства исследователей, оба эти процесса связаны с делением клеток. В пользу этого мнения говорят следующие факты. Если одновременно с антигеном ввести радиоактивный тимидин, то в ядрах всех образовавшихся после иммунизации АОК обнаруживается радиоактивная метка (Hünig e. a., 1974). Ингибиторы митоза тормозят индукцию и развитие антителиобразования. Добавленный к культурам радиоактивный тимидин с высокой удельной активностью накапливается в ядрах пролиферирующих клеток и убивает их, при этом прекращается нарастание числа АОК (Фриденштейн, Чертков, 1969; Носсел, 1973).

Наряду с этим имеются и данные, убедительно указывающие на возможность (по крайней мере при некоторых условиях) превращения без деления клеток, не образующих антитела, в клетки, их образующие. Так, в некоторых случаях иммунизация вызывает столь быстрое появление АОК или увеличение их числа, что это трудно объяснить делением. При действии некоторых митогенов на суспензию клеток селезенки число АОК может за 1 час увеличиться почти в 2 раза (Rich, Pierce, 1973). Время удвоения числа АОК в клеточных культурах иногда составляло всего лишь 3,4 часа (Fidler, 1975) или 4,0 часа (Dutton, Mishell, 1967). Между тем, как мы видели выше, продолжительность митотического цикла АОК, определенной различными методами, была не меньше 8—13 час. Культивирование перитонеальных клеток с антигеном приводило к появлению АОК даже в том случае, когда в среде присутствовали ингибиторы митоза (например, колхицин) (Bussard, 1969). На то, что нарастание числа АОК после иммунизации не связано с размножением одного клона АОК, образовавшегося при индукции антителиобразования, указывают опыты в полнакриламидных камерах. В таких камерах клетки суспензии селезенки мыши разделены на отдельные группы (фокусы). Оказалось, что суммарное увеличение числа АОК происходило не толь-

ко за счет размножения АОК в фокусах, где они уже присутствуют, а также за счет появления АОК в новых фокусах, ранее их не содержавших (Marbrook, Haskill, 1974).

На основании этих и некоторых других фактов ряд исследователей склонен признать, что увеличение числа АОК (во всяком случае при некоторых условиях), может быть связано с двумя процессами: делением клеток, образующих данное антитело, и переходом к антителообразованию клеток, которые ранее антител не образовывали (процесс вовлечения в антителообразование) (Dutton, Mishell, 1967; Fahey, 1973; Sulitzeanu et al., 1973).

В.6. ФАКТОРЫ, ОГРАНИЧИВАЮЩИЕ НАРАСТАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОСИНТЕЗА АНТИТЕЛ И УВЕЛИЧЕНИЕ ЧИСЛА АОК

В начале раздела были представлены данные, свидетельствующие о том, что благодаря экспоненциальному росту содержания антител и числа АОК их количество в течение нескольких дней после иммунизации могло бы превысить общее количество белков и клеток животного. Прекращение нарастания числа АОК и усиление биосинтеза антител могут быть обусловлены многими явлениями. Мы остановимся лишь на некоторых: 1) истощение потенции пролиферации изучаемого клона АОК и истощение клеток-предшественников, необходимых для возникновения нового клона АОК; 2) истощение факторов, необходимых для пролиферации или вовлечения изучаемых АОК (выведение и разрушение антигена, истощение образований, необходимых для пролиферации хелперных Т-клеток и т. д.); 3) появление факторов, активно тормозящих экспансию изучаемого клона. Этими факторами могут быть антитела, образовавшиеся в первые дни после иммунизации, специфические или неспецифические ингибиторы, возникающие в организме в ответ на иммунизацию или пролиферацию образовавшегося клона, супрессорные Т- или В-клетки и т. д. Фаза снижения количества синтезируемых антител и числа АОК может явиться либо следствием естественной, невосполняемой гибели АОК, либо следствием активного процесса, приводящего к гибели АОК или к прекращению синтеза ими антител.

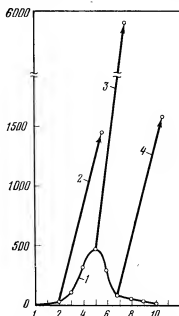
В.6.1. Истощение потенции к пролиферации изучаемого клона АОК

Ранее многие исследователи считали, что прекращение нарастания числа АОК после достижения пика антителообразования связано с истощением их потенции к пролиферации благодаря тому, что АОК по мере дифференциации превращались в тупиковые, неспособные к делению зрелые плазматические клетки. Однако в настоящий момент вряд ли можно считать обоснованной такую точку зрения. Прежде всего против нее говорит то, что иногда в период максимального пика плазматические клетки составляют лишь 10% присутствующих АОК (Thorntwaite, Leif, 1974).

Еще более определенно против этой точки зрения говорят данные, полученные при последовательном переносе облученным мышам клеток

Рис. 34. Сравнение нарастания числа АОК в организме и в культуре клеток селезенки, извлеченных из иммунизированного животного

1 — изменение содержания АОК в организме;
2—4 — изменение содержания АОК при культивировании в течение четырех суток клеток, извлеченных через двое (2), четверо (3) и шесть суток (4) после иммунизации.
По оси абсцисс — время после иммунизации, сут; по оси ординат — число АОК на 10^6 живых клеток



селезенки, взятых первоначально от необлученной и иммунизированной сингенной мыши. Если мышам-реципиентам, помимо клеток, вводили антиген, то происходила интенсивная пролиферация клона АОК, образовавшегося в первичном необлученном доноре. При проведении таких опытов Виллиамсон и Асконас получили клон АОК, образующий антитела против ДНФ. Согласно их расчетам, клетки этого клона были способны к такому числу удвоений, в результате которого могло бы образоваться 10^{27} клеток (Williamson, Askonas, 1972).

На чрезвычайно высокий пролиферативный потенциал указывают и аналогичные эксперименты, в которых в качестве антигена использовали эритроциты барана. Расчет показал, что при последовательных переносах каждый предшественник АОК способен совершить 38—40 делений, в результате которых мог бы образовать 10^{12} АОК (Möller, 1968).

Опыты по извлечению селезенки в эти периоды и культивированию их с антигеном вне организма указывают, что пролиферативный потенциал АОК не исчерпан не только в период максимального пика антителообразования, но и в период, когда антителообразование снижается. Было установлено, что вне организма число АОК быстро росло, а не уменьшалось, как это произошло бы, если бы селезенка осталась в интактном организме. В результате этого за 3—4 дня число АОК в культурах во много превышало максимальное число АОК в интактном организме (10 000—60 000 вместо 500—1000 АОК на 10^6 клеток селезенки) (Dutton, Mishell, 1967; Гурвич и др., 1974). Так, в наших опытах, проводившихся на мышах С57BL/6, если селезенка оставалась в организме, то число АОК между 4-м и 8-м днями после первичной иммунизации эритроцитами барана уменьшалось в 5,5 раза (с 273 до 49 АОК на 10^6 клеток). Если селезенку на 4-й день извлекали и ее клетки инкубировали в культурах, то за тот же период количество АОК увеличивалось в 23 раза (с 273 до 6353 АОК на 10^6 клеток) (рис. 34). Даже в том случае, когда

селезенку извлекали в период сильнейшего падения антителиобразования (на 7-й день после иммунизации) в суспензии ее клеток, культивируемых вне организма, начиналось энергичнейшее нарастание числа АОК, которое за четверо суток увеличивалось в 26 раз (с 60 до 1560 АОК на 10^6 клеток).

Описанный эффект нельзя объяснить тем, что на 4-й день после первичной иммунизации в организме мышей создается нехватка антигена, а к помещенным в культуры клеткам антиген добавляется вновь. Оказалось, что повторное введение интактным животным антигена через четыре дня после первичного приводит лишь к незначительному (в 1,5—2,0 раза) увеличению числа АОК. Несколько большее влияние, но далеко не такое, как *in vitro* оказывает антиген, введенный на 7-й день после первичной иммунизации (Гурвич и др., 1974).

На основании приведенных выше данных можно сделать вывод, что прекращение нарастания синтеза антител и числа АОК и последующее их снижение не связано с исчерпанием пролиферативной способности клона или недостатком антигена. По-видимому, здесь мы сталкиваемся с действием факторов, активно тормозящих эти процессы. В пользу этой точки зрения говорит также и быстрота уменьшения числа АОК в период торможения антителиобразования: их число за два дня иногда уменьшалось в 10 раз. Время жизни АОК, по некоторым данным (Klinman, Press, 1975), значительно больше.

V.6.2. Торможение антителиобразования присутствующими в среде антителами той же специфичности

К началу фазы торможения в организме животного и человека уже успевает накопиться значительное количество антител против использовавшегося для иммунизации антигена. Напрашивается предположение, что именно эти антитела по принципу обратной связи, плюс — минус взаимодействия по М. М. Завадовскому (1931) тормозят синтез клетками таких же антител. И, действительно, показано, что антитела, присутствующие в кровотоке или культуральной среде, могут тормозить антителиобразование.

При оценке этих данных необходимо четко различать действие антител на различные фазы иммунного процесса: 1) на уже протекающие в клетках биосинтез и секрецию антител, 2) на индукцию антителиобразования при первичной и вторичной иммунизации, 3) на нарастание числа АОК при развитии антителиобразования, 4) на скорость падения числа АОК в фазу торможения.

Влияние гомологичных антител на уже идущий процесс их биосинтеза изучалось нами на клетках селезенки кроликов, извлеченных в период максимально интенсивного антителиобразования и кратковременно культивируемых *in vitro*. Об интенсивности биосинтеза антител в культивируемых клетках судили по включению ^{14}C -глицина в антитела, извлекаемые соответствующим иммуносорбентом (иммобилизованным антигеном).

Кроликов иммунизировали двумя белками (сывороточным альбумином человека и гамма-глобулином лошади) и в клетках их селезенки шел энергичный синтез антител против обоих антигенов (табл. 10). До-

Таблица 10

Влияние присутствующих в среде антител на количество синтезируемых гомологичных антител (имп/мин) клетками селезенки кролика, инкубируемыми *in vitro*

Инкубация	Опыт 1			Опыт 2		
	Анти-ЯА (контроль)	Анти-САЧ	Анти-ГГЛ	Анти-ЯА (контроль)	Анти-САЧ	Анти-ГГЛ
Без добавления антител	14	630	712	25	415	556
Добавлены антитела (442 мкг/мл) против САЧ	—	—	—	23	501	632
Добавлены антитела (431 мкг/мл) против ГГЛ	22	542	745	—	—	—

Обозначения. САЧ—сывороточный альбумин человека; ГГЛ — гамма-глобулин лошади; ЯА — яичный глобулин.

Примечание. Опыт 1 и 2 различаются по специфичности добавляемых антител.

бавление в среду чистых антител против САЧ или ГГЛ не оказывало заметного влияния на биосинтез гомологичного антитела (Гурвич и др., 1964).

Другие исследователи, использовавшие иные методы (Vann, 1969; Tew e. a., 1973), также пришли к выводу, что присутствие антител в окружающей клетки среде не влияет на биосинтез этими клетками гомологичных антител.

Совершенно по-другому антитела влияли на развитие иммунного процесса как в организме, так и в клеточных культурах. Введение животным антител до инъекции им антигена или вскоре после этого резко тормозит первичную реакцию. Ингибирующее действие молекул антитела было более сильным, чем $F(ab')_2$ -фрагментов из них. Fab-фрагменты были неэффективны или малоэффективны (Uhr, Möller, 1968; Fitch, 1975). Это торможение специфично. Даже если ввести антитела против части детерминант на молекуле (например, против $F(ab')_2$ -фрагментов IgG2 морской свинки), то при иммунизации цельными молекулами тормозится синтез антител против этих детерминант. Синтез антител против остальных детерминант на той же молекуле (т. е. против детерминант Fc-фрагментов в описываемом случае) может быть даже большим, чем в норме (Pincus e. a., 1971).

Добавленные извне антитела ингибируют также развитие клеток памяти и антителообразование в культурах. В определенных условиях гомологичные антитела ингибируют и вторичную иммунную реакцию, хотя в этом случае их действие выражено хуже.

Ингибирующее действие антител пытались объяснить по-разному: 1) уменьшением количества доступного антигена, 2) изменением распределения антигена среди тканей, 3) нарушением метаболизма антигена, 4) прямым воздействием антител (или их комплексов с антигеном) на рецепторы В-клеток, 5) действием антител на прилипающие А-клетки, 6) блокированием взаимодействия Т-клеток с антигеном и В-клетками (Möller, 1968; Uhr, Möller, 1968; Abrahams e. a., 1973; Fitch, 1975).

Независимо от механизма действия антител, присутствующих в окружающей В-клетки среде, нельзя не учитывать их влияние на развитие

иммунного процесса. Однако можно привести ряд аргументов против попытки объяснить действием этих антител резкое торможение антителиобразования, сменяющее его быстрый рост. Антитела оказывают сильное тормозящее действие лишь в том случае, если они добавлены до иммунизации или вскоре после нее. Антитела, добавленные через 1—2 сут после иммунизации, не действуют или действуют незначительно (Henry, Jerne, 1968; Uhr, Möller, 1968; Fitch, 1975). Между тем в крови иммунизированного животного антитела в заметном количестве появляются не раньше чем через двое суток. Начало фазы торможения, как правило, не зависит от количества антител, накопившихся к этому моменту в крови: в наших опытах на кроликах оно происходило в одно и то же время как при содержании в крови 0,1 мг, так и 15 мг антител в 1 мл (Оловников, Гурвич, 1966). Вторичная иммунная реакция подавляется антителами значительно хуже, чем первичная (Uhr, Möller, 1968; Fitch, 1975), а фаза торможения при вторичной реакции выражена не менее четко, чем при первичной.

Введенные животному антитела уменьшают число АОК, образующихся при индукции антителиобразования, но не влияют на скорость пролиферации клеток уже образовавшегося клона АОК (Rowley e. a., 1969; Fitch, 1975).

V.6.3. Значение супрессорных Т- и В-лимфоцитов для развития фазы торможения антителиобразования

Хотя впервые супрессоры были обнаружены сравнительно недавно (Gershon, Kondo, 1970), их изучение продвинулось далеко (Baker, 1975; Benacerraf e. a., 1975; Dutton, 1975; Gershon, 1975; см. также раздел VII.2.).

Оказалось, что Т-супрессорные клетки играют существенную роль в развитии как клеточного, так и гуморального иммунитета. В частности, велика их роль в развитии ряда форм толерантности (Gershon, Kondo, 1970; Weigle e. a., 1975), и особенно толерантности малой дозы (Kölsch e. a., 1975). С их функцией, по-видимому, связана аллотипическая супрессия. Накопление Т-супрессоров с возрастом обуславливает падение иммунной реактивности животных при старении (Segre, Segre, 1976), а уменьшение их содержания приводит к резкому усилению склонности к образованию аутоантител (Krahaug e. a., 1976).

Параллельно с изучением роли Т-супрессоров были разработаны методы их фракционирования (Dutton, 1975; Gerber, Steinberg, 1975), была показана их гетерогенность (например, наличие среди них короткоживущих и долгоживущих форм), различие локализации Т-супрессоров и Т-хелперов в органах (Baker, 1975).

Удалось показать, что действие Т-супрессоров осуществляется путем выделения медиаторов (Tada e. a., 1975; см. также раздел VII.1.1.).

Т-супрессоры можно подразделить на две группы: антигенспецифические и антигеннеспецифические. Так, после иммунизации мышей комплексом МСАБ — ГАТ (метилированный сывороточный альбумин быка — L-глутаминовая кислота⁶⁰, L-аланин⁶⁰, L-тирозин¹⁰) образуются Т-супрессоры, ингибирующие развитие антителиобразования к этому антигену, но не к эритроцитам барана (Benacerraf e. a., 1975).

Специфические Т-супрессоры выявлялись и после иммунизации другими антигенами (например, ДНФ, эритроциты барана или гамма-глобулин человека) (Doyle e. a., 1976; Weigle e. a., 1975). Однако в других условиях иммунизация этими же или сходными антигенами приводит к появлению неспецифических Т-супрессоров. К такому же результату может приводить действие митогенов (например, конканавалина А) (Dutton, 1975).

Механизм действия Т-супрессоров неясен. Они могут действовать либо прямо на В-клетки, либо опосредованно, например уменьшая число способствующих антителообразованию Т-клеток. Сейчас нет сомнения в том, что Т-супрессоры участвуют в подавлении антителообразования при многих иммунологических процессах. Менее ясно, в какой степени с действием Т-супрессоров связан перелом кривой антителообразования после достижения пика этого процесса.

В пользу значения Т-супрессоров в развитии этого феномена свидетельствуют следующие данные: 1) иммунизация приводит к увеличению числа этих клеток (причем это увеличение иногда происходит даже тогда, когда иммунизация не индуцирует антителообразование); 2) это увеличение можно выявить уже через трое суток после введения антигена (Berassega e. a., 1975). Инъекция антилимфоцитарной сыворотки мышам, иммунизированным полисахаридом SSS III, снимает на некоторое время перелом кривой антителообразования. Приводятся аргументы в пользу того, что это связано с инактивирующим действием антисыворотки на Т-супрессоры (Baker, 1975). Тем не менее нет оснований считать вопрос решенным. Нарастание числа Т-супрессоров только начинается, когда наступает фаза торможения антителообразования. Введение мышам специфических Т-супрессоров одновременно с их иммунизацией хотя и подавляет образование IgG АОК в дальнейшем, но мало влияет на максимальное количество образовавшихся IgM АОК (Tada e. a., 1975).

И, наконец, мы пытались в прямых опытах проверить, действительно ли во время фазы торможения в селезенке накапливаются супрессорные клетки, тормозящие пролиферацию АОК. С этой целью клетки селезенки, извлеченные в период наиболее выраженного торможения антитело-

Таблица 11

Число АОК (на 10^6 клеток) при культивировании (в течение четырех суток) клеток селезенки, извлеченных на разных стадиях иммунного процесса

Суспензия	До начала культивирования	После раздельного культивирования	После совместного культивирования	
			фактическое	ожидаемое
№ 1	5,1 (3,4—7,5)	1536 (1185—1986)	—	—
№ 2	43 (23—81)	2101 (1707—2586)	—	—
№ 1+№ 2 (1:1)	—	—	2738 (2323—3227)	1818 (1402—2359)

Примечание. Суспензии получены из селезенки, извлеченной после иммунизации (№ 1—через двое суток, № 2—через 7 суток).

образования (через шесть дней после иммунизации мышей эритроцитами барана), добавляли *in vitro* к суспензии клеток селезенки (извлеченной через два дня после иммунизации), в которой уже заканчивалась индукция антителиобразования и протекала активная пролиферация АОК. Добавление таких клеток не только не тормозило нарастание числа АОК, но даже несколько его стимулировало (на 151%, табл. 11) (Гурвич и др., 1974). Для выяснения реального механизма торможения необходимы дальнейшие исследования.

V.6.4. Значение накопления гуморальных ингибиторов для фазы торможения антителиобразования

Перелом кривой антителиобразования может быть связан с действием каких-то гуморальных ингибиторов, присутствующих в кровотоке.

В сыворотке крови удалось выявить вещества, ингибирующие антителиобразование. В частности, было показано, что присутствующие в сыворотке альфа-глобулины содержат компонент (иммунорегуляторный альфа-глобулин — ИРАГ или нормальный иммуноподавляющий белок — НИБ), который тормозит как реакцию клеточного иммунитета, так и антителиобразование (Kamrin, 1959; Nelkein, 1973; Occhino *et al.*, 1973).

Введение мышам 6—20 мг этого вещества за 48 час до иммунизации тормозит антителиобразование на 85%. Описываемый фактор влияет на число АОК, по-видимому, не прямо, а через Т-клетки (Menzoian *et al.*, 1974). Еще более эффективно тормозит антителиобразование альфа-фетопротейн (Murgita, Tomasi, 1975a, b), следы которого присутствуют и в организме взрослых. Нет оснований думать, что перелом кривой антителиобразования связан с действием этих белков. В частности, об этом говорит то, что ИРАГ лучше всего действует при введении животным до иммунизации, а в культурах — в течение первых двух суток после начала культивирования (Veit, Michael, 1973).

Перелом кривой может быть связан с появлением в кровотоке ингибиторов, образующихся в тимусе или в каком-либо другом органе. Для проверки такой возможности мы на разных стадиях иммунного процесса извлекали у кроликов селезенки и инкубировали их в течение 2—3 сут, перфузируя питательным раствором через сосуды. О синтезе антител против ГГЛ и неспецифических иммуноглобулинов судили по включению ¹⁴C-глицина в эти белки. Оказалось, что устранение влияний, исходящих от остального организма, существенно не изменяло кривой антителиобразования. В селезенках, извлеченных в экспоненциальную фазу (через двое суток после иммунизации), интенсивность синтеза антител и вне организма продолжала расти. Если селезенки извлекали в начале фазы торможения (на 4-й день после иммунизации), то при инкубации их *in vitro* в течение двух суток скорость синтеза антител быстро падала (Гурвич, Николаева, 1971).

Описанные опыты ни в коем случае не свидетельствуют против того, что торможение обусловлено локальным действием ингибирующих метаболитов, образующихся в лимфатических клетках при действии на них антигена и при взаимодействии между Т- и В-лимфоцитами (Waksman, Namba, 1976). Невозможность обнаружить эти метаболиты в

циркуляции может быть связана с их лабильностью или с сильным разбавлением. По-видимому, легче их обнаружить в опытах *in vitro*. В подобных опытах, согласно утверждениям некоторых исследователей, удается выявить накопление как матернала, неспецифически ингибирующего антителиобразование (Ambrose, 1973), так и матернала, который не реагирует с гомологичным антигеном, но специфически подавляет антителиобразование к нему (Gorczynski, 1974).

V.6.5. Значение локальных взамотормозящих межклеточных влияний для развития фазы торможения антителиобразования

Многочисленные исследования показали, что контактное торможение, возникающее в монослойных культурах, играет большую роль в регуляции роста клеток (Васильев, Маленков, 1968). В последние годы появились работы, в которых изучалось значение плотности культивируемых суспензий различных клеток для их роста (Glinos, Bartos, 1974; Glinos *et al.*, 1973).

В наших опытах было показано, что развитие первичного антителиобразования в суспензии клеток селезенки мышей, культивируемых *in vitro*, сильно зависит от плотности культивируемых клеток. В определенных условиях увеличение плотности в 2 или 4 раза приводило к 10-кратному или даже 100-кратному уменьшению числа образующихся АОК (рис. 35). Подавление антителиобразования в плотных культурах связано не с нарушением индукции АОК, а с последующим торможением пролиферации клеток этого клона. На это указывает то, что торможение возникало и в тех случаях, когда плотность суспензии клеток увеличивали после окончания индукции антителиобразования (через один или три суток после начала инкубации клеток с антигеном) (рис. 36) (Гурвич и др., 1975, 1976; Gurvitch *et al.*, 1975). Особо четко это выявилось при использовании суспензии клеток селезенки, которые предварительно культивировали с антигеном в течение трех суток и в которых происходило экспоненциальное нарастание числа АОК. После увеличения плотности таких культур нарастание числа АОК тормозилось очень быстро. Оно было четко выражено уже через 2—4 часа. Одновременно в клетках уплотненных культур резко тормозилось включение радиоактивных предшественников в ДНК, и особенно РНК. Включение метки в белки в первые 2—3 часа после уплотнения культур не снижалось или снижалось незначительно (Gurvitch, Grigoryeva, 1976).

Чтобы выяснить, могут ли играть какую-либо роль локальные взамотормозящие влияния в развитии иммунного процесса, было изучено влияние плотности на антителиобразование в суспензии клеток селезенки, извлеченных из иммунизированных мышей. Оказалось, что в таких суспензиях нарастание числа АОК очень мало зависит от плотности культивируемых клеток.

Увеличение плотности, которое в суспензии клеток от неиммунизированного животного тормозило антителиобразование в 10—100 раз, в суспензии клеток от иммунизированного животного тормозило его всего

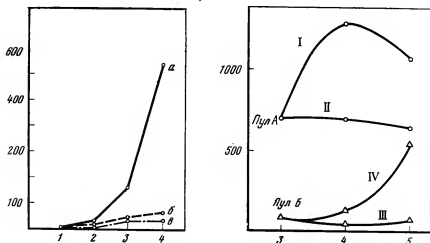


Рис. 35. Нарастание числа АОК в культурах, содержащих различное число клеток в начале инкубации

a — $50 \cdot 10^6$; *б* — $10 \cdot 10^6$; *в* — $20 \cdot 10^6$. По оси абсцисс — время инкубации, дни; по оси ординат — число АОК на 10^6 живых клеток

Рис. 36. Влияние на нарастание числа АОК изменений плотности суспензии клеток, которые предварительно инкубировались трое суток с целью индукции образования антител

Пула А получен объединением «оптимальных» по плотности проб, в которых к 3-м суткам образовалось значительное число АОК (около 700 на 10^6 клеток). Из пула А приготовлены пробы с «оптимальной» концентрацией клеток, где число АОК при дальнейшей инкубации быстро росло (I), и «плотные» пробы, в которых число АОК перестало увеличиваться (II). Пула Б получен объединением «плотных» проб, в которых число АОК почти не росло. В пробах, приготовленных из этого пула, число АОК при дальнейшей инкубации не увеличивалось, если плотность суспензии оставалась высокой (III), и начинало быстро расти, если плотность снижалась до оптимальной (IV). По оси абсцисс — время инкубации, дни; по оси ординат — число АОК на 10^6 клеток

лишь в 1,5—2 раза или не тормозило совсем. Интересно отметить, что при увеличении плотности суспензии иммунных клеток суммарный синтез ДНК в суспензии тормозился очень сильно, не менее сильно, чем в суспензии клеток неиммунизированных животных. Снятие взаимного торможения развивалось после иммунизации животного не сразу, для этого необходимо было не менее суток. Описываемый эффект был специфичным в отношении антигена. Так, введение мышам эритроцитов барана снимало тормозящее влияние плотности суспензии для нарастания числа АОК, образующих антитела против эритроцитов барана, но не АОК, образующих антитела против других антигенов (например, эритроцитов курицы) (Gurvitch e. a., 1975; Григорьева и др., 1977).

Полученные нами факты позволяют сделать вывод, что подобно тому как малигнизация снимает контактное торможение, иммунизация специфически снимает взаимотормозящие влияния. Это позволяет предположить, что они играют определенную роль в регуляции антителиобразования.

Литература

- Бернет Ф. Клеточная иммунология. М., «Мир», 1971.
- Васильев Ю. М., Маленков А. Г. Клеточная поверхность и реакции клеток. Л., «Медицина», 1968.
- Григорьева О. С., Корукова А. А., Гурвич А. Е. Иммунологическая специфичность локальных тормозящих межклеточных взаимодействий.—Бюл. эксперим. биол. и мед., 1977, 84, с. 700—703.
- Гурвич А. Е. Анализ механизма образования антител.—В кн.: Всесоюзная научно-техническая конференция по применению радиоактивных и стабильных изотопов в народном хозяйстве и науке. М., Госэнергоиздат, 1958, с. 55—61.
- Гурвич А. Е., Григорьева О. С., Корукова А. А. Сравнение действия антигена в организме и *in vitro* на разных стадиях иммунного процесса.—Бюл. эксперим. биол. и мед., 1974, 78, с. 74—76.
- Гурвич А. Е. и др. Влияние присутствующих в среде антител на биосинтез подобных антител клетками селезенки.—Докл. АН СССР, 1964, 155, с. 482—485.
- Гурвич А. Е., Корукова А. А., Григорьева О. С. Значение плотности суспензии клеток селезенки в культуре для развития иммунной реакции.—Бюл. эксперим. биол. и мед., 1975, 79, с. 66—70.
- Гурвич А. Е., Корукова А. А., Григорьева О. С. Механизм подавления антителообразования в суспензионных культурах с большой плотностью.—Бюл. эксперим. биол. и мед., 1976, 80, с. 312—344.
- Гурвич А. Е., Николаева А. И. Синтез антител и неспецифических иммуноглобулинов изолированной селезенки, перфузируемой вне организма.—Биохимия, 1971, 36, с. 783—790.
- Завадовский М. М. Динамика развития организма. М., 1931.
- Незлич Р. С. Строение и биосинтез антител. М., «Наука», 1972.
- Носсел Г. Антитела и иммунитет. М., «Медицина», 1973.
- Оловников А. М., Гурвич А. Е. Изучение антигенных свойств белково-целлюлозного иммуносорбента.—Вопр. мед. хим., 1966, 12, с. 112—113.
- Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л. Клеточные основы иммунитета. М., «Медицина», 1969.
- Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Покровский Б. В., Протасова Т. Н. Циклические нуклеотиды как внутриклеточные передатчики действия гормонов.—Усп. соврем. биол., 1975, 80, с. 351—369.
- Abrahams S., Phillips R. A., Miller R. G. Inhibition of the immune response by 7S antibody. Mechanism and site of action.—J. Exptl Med., 1973, 137, p. 870—892.
- Ada G. L., Byrt P. Specific inactivation of antigen — reactive cells with 125 I-labelled antigen.—Nature, 1969, 222, p. 1291—1292.
- Ambrose C. T. Regulation of the secondary antibody response in vitro. II. Chemical properties of an antibody inhibitory material (AIM) produced in antigen-stimulated rabbit lymph node organ culture.—J. Exptl Med., 1973, 137, p. 1369—1392.
- Anderson W. B., Pastan I. Altered adenylate cyclase activity: its role in growth regulation and malignant transformation of fibroblasts.—Adv. Cycl. Nucl. Res., 1975, 5, p. 681—698.
- Anderson J., Coutinho A., Melchers F., Watanabe T. Growth and maturation of single clones of normal murine T and B lymphocytes in vitro.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1977, 41, p. 237—243.
- Anteunis A. Cytochemical and ultrastructural studies concerning the cell coat glycoproteins in normal and transformed human blood lymphocytes.—Exptl Cell Res., 1974, 84, p. 31—39.
- Attardi G., Cohn M., Horibata K., Lennox E. S. Antibody formation by rabbit lymph node cells. I. Single cell responses to several antigens.—J. Immunol., 1964, 92, p. 335—345.
- Baker P. Y. Homeostatic control of antibody responses: a model based on the recognition of cell-associated antibody by regulatory T cells.—Transplant. Rev., 1975, 26, p. 3—20.
- Barton M. A., Diener E. A new perspective on B cell triggering: control of immune response by organization changes in the lipid bilayer.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 5—22.
- Benacerraf B., Kapp Y. A., Debre P. e. a. The stimulation of specific suppressor T cells in genetic nonresponder mice by linear random copolymers of L-amino acids.—Transplant. Rev., 1975, 26, p. 21—38.
- Boyden S. V. Natural antibodies and the immune response.—Adv. Immunol., 1966, 5, p. 1—28.
- Bretscher P. A. The two signal model for B cell induction.—Transplant Rev., 1975, 23, p. 37—48.
- Bretscher P. A., Cohn M. A theory of self-nonself discrimination.—Science, 1970, 169, p. 1042—1049.
- Burnet F. M. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection.—Austral. J. Sci., 1957, 20, p. 67—77.
- Burnet F. M., Fenner F. The production of antibodies. Melbourne, Macmillan, 1949.

- Bussard A. E. Properties of antigens.—In: Immunological tolerance. N. Y., Acad. Press, 1969, p. 43—45.
- Byars N., Kidson C. Programmed synthesis and export of immunoglobulin by synchronized myeloma cells.—*Nature*, 1970, 226, p. 648—650.
- Chandra P., Gericke D., Backer B. Effects of nucleoside cyclic monophosphates on some enzymatic processes, antibody synthesis, and tumour growth in mice.—In: Cyclic AMP, cell growth and the immune response. N. Y., Lichtenstein Parker, 1974, p. 358—376.
- Coffino P., Gray J. W., Tomkins G. M. Cyclic AMP, a nonessential regulator of the cell cycle (lymphoma/mutants/flow microfluorimeter).—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, 72, p. 878—882.
- Colberg J. E., Dray S. Localization by immunofluorescence of gammaglobulin allotypes in lymph node cells of homozygous and heterozygous rabbits.—*Immunology*, 1964, 7, p. 273—290.
- Coudere Y., Blaux C., Birrien Y. L., Liacopoulos P. The potentiality of antibody producing cells. I. Bispecific cell occurrence in double stimulated cultures of syngenic or allogenic spleen cells of the mouse.—*Immunology*, 1975a, 29, p. 653—664.
- Coudere Y., Blaux C., Liacopoulos P. The potentiality of antibody-producing cells. II. Evidence for two antibody molecules of different specificities secreted by micromanipulated bispecific mouse spleen cells.—*Immunology*, 1975b, 29, 665—674.
- Coutinho A. The theory of the «one nonspecific signal» model for B cell activation.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 49—56.
- Cowan N. Y., Milstein C. Automatic monitoring of biochemical parameters in tissue culture. Studies on synchronously growing mouse myeloma cells.—*Biochem. J.*, 1972, 128, p. 445—454.
- Cunningham A. Y. Evolution in microcosm: the rapid somatic diversification: the rapid somatic diversification of lymphocytes.—*Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127C, p. 531—549.
- Cunningham A. Y., Fordham S. A. Antibody cell daughters can produce antibody of different specificities.—*Nature*, 1974, 250, p. 669—671.
- De Rubertis F. R., Zenser T. V., Adler W. H., Hudson T. Role of cyclic adenosine 3':5' monophosphate in lymphocyte mitogenesis.—*J. Immunol.*, 1974, 113, p. 151—161.
- Doyle M. D., Parks D. E., Weigle W. O. Specific suppression of the immune response by HGG tolerant spleen cells. I. Parameters affecting the level of suppression.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 1640—1645.
- Dukor P., Hartman K.-U. Bound C3 as the second signal for B-cell activation.—*Cell. Immunol.*, 1973, 7, p. 349—356.
- Du Pasquier L. Ontogeny of the immune response in animals having less than one million lymphocytes: the larvae of the toad *Alytes obstetricans*.—*Immunology*, 1970, 19, p. 353—362.
- Dutton R. W. Suppressor T cells.—*Transplant. Rev.*, 1975, 26, p. 39—55.
- Dutton R. W., Mishell R. I. Cellular events in the immune response of normal spleen cells to erythrocyte antigens.—*Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1967, 32, p. 407—414.
- Fahey Y. L. Control of proliferation on the immune system.—In: Control of proliferation in animal cells. N. Y., Cold Spring Harbor Lab., 1973, p. 349—391.
- Fidler Y. M. In vivo immune response to TNP hapten coupled to thymus-independent carrier lypopolysaccharide.—*Cell. Immunol.*, 1975, 16, p. 223—236.
- Fitch F. W. Selective suppression of immune responses. Regulation of antibody formation and cell-mediated immunity by antibody.—*Progr. Allergy*, 1975, 19, p. 195—244.
- Fröland S. S., Natvig Y. B. Class, subclass, and allelic exclusion of membrane-bound Ig of human B lymphocytes.—*J. Exptl Med.*, 1972, 136, p. 409—414.
- Fu S. M., Winchester R. Y., Kunkel H. G. Similar idiotypic specificity for the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes.—*J. Immunol.*, 1975, 114, p. 250—252.
- Gally Y. A., Edelman G. M. The genetic control of immunoglobulin synthesis.—*Annual Rev. Genet.*, 1972, 6, p. 1—46.
- Gearhart P. Y., Sigal N. H., Klinman N. R. Production of antibodies of identical idio-type but diverse immunoglobulin classes by cells derived from a single stimulated B cell. (V gene sharing simultaneous class production monoclonal antibody).—*Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 1975, 72 p. 1707—1711.
- Gerber N. L., Steinberg A. D. Physical separation of «suppressor» from «helper» thymocytes.—*J. Immunol.*, 1975, 115, p. 1744—1745.
- Gershon R. K. A disquisition on suppressor T cells.—*Transplant. Rev.*, 1975, 26, p. 170—185.
- Gershon H., Bauminger S., Sela M., Feldman M. Studies on the competence of single cells to produce antibodies of two specificities.—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 223—233.
- Gershon R. K., Kondo K. Cell interactions in the production of tolerance: the role of thymic lymphocytes.—*Immunology*, 1970, 18, p. 723—737.

- Glinos A. D., Bartos E. M. Density dependent regulation of growth in L cell suspension cultures. III. Elevation of specific activity of acetylcholinesterase.—*J. Cell. Physiol.*, 1974, 83, p. 131—140.
- Glinos A. D., Vail Y. M., Taylor B. Density-dependent regulation of growth in L cell suspension cultures. II. Synthesis of total protein and collagen in presence of rapidly declining oxygen tensions.—*Exptl Cell Res.*, 1973, 78, p. 319—328.
- Gorczynski R. M. Specific modulation of antibody production in vitro by soluble mediators.—*Immunology*, 1974, 26, p. 77—95.
- Grubb R. The genetic markers of human immunoglobulins. London, Chapman & Hall, 1970.
- Gurvich A. E., Grigoryeva O. S. [Гурвич А. Е., Григорьева О. С.]. The rapid onset of inhibition of antibody-forming cell proliferation upon an increase in density.—*Europ. J. Immunol.*, 1976, 6, p. 757—759.
- Gurvich A. E., Korukova A. A., Grigoryeva O. S. [Гурвич А. Е., Корукова А. А., Григорьева О. С.]. The immune response in stationary suspension cultures containing different number of cells. The surface density effect.—*Immunology*, 1975, 28, p. 271—281.
- Haas W. Separation of antigen-specific lymphocytes. II. Enrichment of hapten-specific antibody-forming cell precursors.—*J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 1015.
- Haas W., Layton J. E. Separation of antigen-specific lymphocytes. I. Enrichment of antigen-binding cells.—*J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 1004—1014.
- Hadden J. W., Hadden E. M., Haddox M. K., Goldberg N. D. Guanosine 3',5' cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1972, 69, p. 3024—3027.
- Hadden J. W., Hadden E. M., Sadlik Y. R., Coffey R. G. Effects of concanavalin A and a succinylated derivative on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels (lymphocyte activation/lectins/adenosine 3',5' cyclic monophosphate/guanosine 3',5' cyclic monophosphate).—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 1717—1721.
- Haimovich Y., Du Pasquier L. Specificity of antibodies in amphibian larvae possessing a small number of lymphocytes.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, 70, p. 1898—1902.
- Haimovich Y., Tarrab R., Sulica A., Sela M. Antibodies of different specificities in normal rabbit sera.—*J. Immunol.*, 1970, 104, p. 1033—1034.
- Hartman K.-U. Possible involvement of C3 during stimulation of B lymphocytes.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 98—104.
- Henry C., Jerne N. K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response.—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 133—152.
- Huff D., Reiter H., Dray S. Cell-free synthesis of peptides bearing rabbit immunoglobulin allotypic markers.—*Immunochimistry*, 1973, 10, p. 821—827.
- Hünig B. T., Schimpl A., Wecker E. Autoradiographic studies on the proliferation of antibody-producing cells in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 754—760.
- Jaroslow B. N., Ortiz-Ortiz L. Hydroxy urea and cell-cycle kinetics of cultured antibody-forming cells.—*Cell. Immunol.*, 1971, 2, p. 164—170.
- Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells.—*Science*, 1963, 140, p. 405.
- Jones P. P., Cebra J. J. Restriction of gene expression in B lymphocytes and their progeny. III. Endogenous IgA and IgM on the membranes of different plasma cell precursors.—*J. Exptl Med.*, 1974, 140, p. 966—976.
- Jones P. P., Cebra J. J., Herzenberg L. A. Immunoglobulin (Ig) allotype markers on rabbit lymphocytes: separation on cells bearing different allotypes and demonstration of the binding of Ig to lymphoid cell membranes.—*J. Immunol.*, 1973, 111, p. 1334—1348.
- Jones P. P., Cebra J. J., Herzenberg L. A. 1974. Restriction of gene expression in B lymphocytes and their progeny. I. Commitment to immunoglobulin allotype.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 581—599.
- Julin M., Karjalainen K., Mäkelä O. Expression of A mouse immunoglobulin V gene in homozygotes and heterozygotes.—*Ann. Immunol.*, 1976, 127, p. 409—418.
- Ishizuka M., Gafni M., Braun W. Cyclic AMP effects on antibody formation and their similarities to hormone-mediated events.—*Proc. Soc. Exptl Biol.*, 1970, 134, p. 963—967.
- Kamrin B. B. Successful skin homografts in mature non-littermate rats treated with fractions containing alpha-globulins.—*Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 1959, 100, p. 58—61.
- Kaplan J. G., Bona C. Proteases as mitogens.—*Exptl Cell Res.*, 1974, 88, p. 388—394.
- Kettman J., Dutton R. W. The role of antigen in the immune response: analysis by limiting dilution methods.—*Cell. Immunol.*, 1975, 17, p. 228—239.
- Kimball E. S., Wolf B. Modulation and regrowth of allotype on normal rabbit peripheral blood lymphocytes: allelic inclusion of b 4 and 6 in single cells.—*Cell. Immunol.*, 1976, 23, p. 11—31.
- Klinman N. R., Press Y. L. Expression of

- specific clones during B cell development.—*Federat. Proc.*, 1975, 34, p. 47—50.
- Knight K., Pernis B.* The expression of VH non-allelic rabbit allotypes in single cells.—In: *Annual report Basel Institute for immunology*, 1975, p. 36.
- Kölsch E., Stumpf R., Weber G.* Low zone tolerance and suppressor T cells.—*Transplant. Rev.*, 1975, 26, p. 56—87.
- Krakauer R. S., Waldmann T. A., Strober W.* Loss of suppressor T cells in adult NZB/NZW mice.—*J. Exptl Med.*, 1976, 144, p. 662—673.
- Liacopoulos P., Couderc Y., Bleux C.* Evidence for multipotentiality of antibody synthesizing cells.—*Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1976, 127, p. 519—530.
- Liberti P., Baglioni C.* Synthesis of immunoglobulin and nuclear protein in synchronized mouse myeloma cells.—*J. Cell. Physiol.*, 1973, 82, p. 113—120.
- MacManus Y. P., Whitfield Y. F., Boynton A. L., Rixon R. H.* Role of cyclic nucleotides and calcium in the positive control of cell proliferation.—*Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 1975, 5, p. 719—734.
- Mäkelä O., Yormalainen S.* Natural anti-hapten antibodies.—*Med. Biol.*, 1974, 52, p. 355—371.
- Marbrook Y., Haskill Y. S.* The in vitro response to sheep erythrocytes by mouse spleen cells: segregation of distinct events leading to antibody formation.—*Cell. Immunol.*, 1974, 13, p. 12—21.
- McCune R. Y., Humphreys R. E., Yocum R. R., Strominger Y. L.* Enhanced representation of HLA antigens on human lymphocytes after mitogenesis induced by phytohemagglutinin or Epstein-Barr virus.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, 72, p. 3206—3209.
- Menzoian Y. O., Glasgow A. H., Nimberg R. D. e. a.* Regulation of T lymphocyte function by immunoregulatory alpha globulin (IRA).—*J. Immunol.*, 1974, 113, p. 266—273.
- Millis A. Y. T., Forrest G. A., Pious D. A.* Cyclic AMP dependent regulation of mitosis in human lymphoid cells.—*Exptl Cell Res.*, 1974, 83, p. 335—343.
- Möller G.* Regulation of cellular antibody synthesis. Cellular 7S production and longevity of 7S antigen-sensitive cells in the absence of antibody feedback.—*J. Exptl Med.*, 1968, 127, p. 291—306.
- Möller G.* One non-specific signal triggers B lymphocytes.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 126—137.
- Murgita R. A., Tomasi T. B.* Suppression of the immune response by α -fetoprotein. I. The effect of mouse α -fetoprotein on the primary and secondary antibody response.—*J. Exptl Med.*, 1975a, 141, p. 269—268.
- Murgita R. A., Tomasi T. B.* Suppression of the immune response by α -fetoprotein. II. The effect of mouse α -fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen-induced lymphocyte transformation.—*J. Exptl Med.*, 1975b, 141, p. 440—452.
- Nelken D.* Normal immunosuppressive protein (NIP).—*J. Immunol.*, 1973, 110, p. 1161—1162.
- Nossal G. J. V., Warner N. L., Lewis H.* Incidence of cells simultaneously secreting IgM and IgG antibody to sheep erythrocytes.—*Cell. Immunol.*, 1971, 2, p. 41—53.
- Oechino Y. C., Glasgow A. H., Cooperband S. B. e. a.* Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from human plasma.—*J. Immunol.*, 1973, 110, p. 685—694.
- Pincus C. S., Lamm M. E., Nussenzweig V.* Regulation of the immune response: suppressive and enhancing effects of passively administered antibody.—*J. Exptl Med.*, 1971, 133, p. 987—1003.
- Plescia O. Y., Yamamoto I., Shimamura T.* Cyclic AMP and immune responses: Changes in the splenic level of cyclic AMP during the response of mice to antigen (antibody formation)/immunoenhancement/immunosuppression/poly(A) - poly(U).—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, 72, p. 888—891.
- Preud'homme Y.-L., Clauvel J. P.* Immunoglobulin D-bearing lymphocytes in primary immunodeficiencies.—*J. Immunol.*, 1975, 114, p. 481—485.
- Rich R. R., Pierce C. W.* Biological expressions of lymphocyte activation. I. Effect of phytomitogens on antibody synthesis in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1973, 137, p. 205—223.
- Rowe D. S., Hug K., Forni L., Pernis B.* Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor.—*J. Exptl Med.*, 1973, 138, p. 965—972.
- Rowley D. A., Fitch F. W., Axelrad M. A., Pierce C. W.* The immune response suppressed by specific antibody.—*Immunology*, 1969, 16, p. 549—559.
- Rowley D. A., Fitch F. W., Mosier D. E. e. a.* The rate of division of antibody-forming cells during the early primary immune response.—*J. Exptl Med.*, 1968, 127, p. 983—1002.
- Rutishauser U., D'Eustachio P., Edelman G. M.* Immunological function of lymphocytes fractionated with antigen-derivatized fibers.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, 70, p. 3894—3898.
- Sado T., Makinodan T.* The cell cycle of blast cells involved in secondary antibody response.—*J. Immunol.*, 1964, 93, p. 696—700.
- Schoenberg L. M., Wolf B.* Evidence for active synthesis of two allelic b locus markers by single lymphocytes from hete-

- rozygous rabbits.—*Cell. Immunol.*, 1976, 23, p. 68—88.
- Segre D., Segre M. Humoral immunity in aged mice. II. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 735—748.
- Sell S., Lowe Y. A., Gell P. G. H. Studies on rabbit lymphocytes in vitro. XI. Superaddition of anti-allotypic lymphocyte transformation: evidence for multipotent lymphoid cells.—*J. Immunol.*, 1970, 104, p. 103—113.
- Sheppard Y. R. The role of cyclic AMP in the control of cell division.—In: *Cyclic AMP, cell growth and immune response*. N. Y., Lichtenstein Parker, 1974, p. 290—301.
- Silverman A. Y., Yagi Y., Pressman D. Monoclonal IgA and IgM in the serum of A single protein (SC). III. Immunofluorescent identification of cells producing IgA and IgM.—*J. Immunol.*, 1973, 110, p. 350—353.
- Smith Y. W., Steiner A. L., Newberry Y. W. M., Parker C. W. Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation.—*J. Clin. Invest.*, 1971, 50, p. 432—441.
- Sulitzeanu D., Marbrook Y., Haskill Y. S. Direct conversion of precursors of PFCs into active PFCs in vitro, without prior cell division.—*Immunology*, 1973, 24, p. 707—710.
- Tada T., Taniguchi M., Takemori T. Properties of primed suppressor T cells and their products.—*Transplant. Rev.*, 1975, 26, p. 106—129.
- Takahashi M., Yagi Y., Moore G. E., Pressman D. Immunoglobulin production on synchronized cultures of human hematopoietic cell lines. I. Variation of cellular immunoglobulin level with the generation cycle.—*J. Immunol.*, 1969, 103, p. 834—843.
- Talmage D. W., Thomas D. W. Is there a stimulator cell for B-lymphocytes.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 202—212.
- Tanigaki N., Yagi Y., Moore G. E., Pressman D. Immunoglobulin production in human leukemia cell lines.—*J. Immunol.*, 1966, 97, p. 634—646.
- Tannenbergh W. Y. K., Malaviya A. N. The life cycle of antibody-forming cells. I. The generation time of 19S hemolytic plaque-forming cells during the primary and secondary responses.—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 894—903.
- Tew J. G., Seif C. H., Harold W. W. The spontaneous induction of anamnestic antibody synthesis in lymph node cell cultures many months after primary.—*J. Immunol.*, 1973, 111, p. 416—423.
- Thomas D. W. Discontinuous antibody secretion during the secondary response to sheep erythrocytes in vitro.—*J. Immunol.*, 1974, 112, p. 1602—1604.
- Thomas D. W., Roberts W. K., Talmage D. W. Antibody synthesis in synchronized mouse spleen cells during the secondary response to sheep erythrocytes in vitro.—*J. Immunol.*, 1975, 114, p. 343—347.
- Thornthwaite Y. T., Leif R. C. The plaque cytogram assay. I. Light and scanning electron microscopy of immunocompetent cells.—*J. Immunol.*, 1974, 113, p. 1897—1908.
- Uhr Y. W., Möller G. Regulatory effect of antibody on the immune response.—*Adv. Immunol.*, 1968, 8, p. 81—130.
- Vann D. C. In vitro antibody synthesis by diffusion chamber cultures of spleen cells. II. Effect of increased levels of free antibody.—*J. Immunol.*, 1969, 102, p. 451—456.
- Veit B., Michael Y. G. Characterization of an immunosuppressive factor present in mouse serum.—*J. Immunol.*, 1973, 111, p. 341—351.
- Vischer T. L. Stimulation of mouse B lymphocytes by trypsin.—*J. Immunol.*, 1974, 113, p. 58—62.
- Vitetta E. S., Uhr Y. W. Immunoglobulins and alloantigens on the surface of lymphoid cells.—*Biochim. biophys. acta*, 1975, 415, p. 253—271.
- Waksman B. H., Namba Y. On soluble mediators of immunologic regulation.—*Cell. Immunol.*, 1976, 21, p. 161—176.
- Watson Y. Cyclic nucleotides as intracellular mediators of B cell activation.—*Transplant. Rev.*, 1975a, 23, p. 223—249.
- Watson Y. The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis.—*J. Exptl Med.*, 1975b, 141, p. 97—111.
- Webb D. R., Stites D. P., Perlman Y. D. e. a. Lymphocyte activation: The dualistic effect of AMP.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 53, p. 1002—1008.
- Wedner H. Y., Parker C. W. Lymphocyte activation.—*Progr. Allergy*, 1976, 20, p. 195—300.
- Weigle W. O., Sieckmann D. G., Doyle M. V., Chiller Y. M. Possible roles of suppressor cells in immunological tolerance.—*Transplant. Rev.*, 1975, 26, p. 186—205.
- Wigzell H., Andersson B. Cell separation on antigen-coated colomus. Elimination of high rate antibody-forming cells and immunological memory cells.—*J. Exptl Med.*, 1969, 129, p. 23—36.
- Wigzell H., Andersson B. Isolation of lymphoid cells with active surface receptor sites.—*Annual Rev. Microbiol.*, 1971, 25, p. 291—308.

- Willcox H. N. A., Humphrey Y. H., Cross A. M. Recovery of B lymphocyte responsiveness after complete radioactive antigen suicide, and the affinity of antibody mode after incomplete suicide.—*Cell. Immunol.*, 1975, **16**, p. 348—361.
- Williamson A. R., Askonas B. A. Senescence of an antibody-forming cell clone.—*Nature*, 1972, **238**, p. 337—339.
- Winchurch R. A. Effects of adenylyl cyclase-stimulating factors of *Vibrio cholerae* on antibody formation.—In: Cyclic AMP, cell growth and the immune response. N. Y., Lichtenstein, Parker, 1974, p. 84—98.
- Wofsy L., Kimura Y., Truffabachi P. Cell separation of affinity columns: the preparation of pure populations of anti-hapten specific lymphocytes.—*J. Immunol.*, 1971, **107**, p. 725—729.
- Wolf B., Janeway C. A., Coombs R. R. A. e. a. Immunoglobulin determinants on the lymphocytes of normal rabbits. III. As4 and As6 determinants on individual lymphocytes and the concept of allelic exclusion.—*Immunology*, 1971, **20**, p. 931—944.
- Yammamoto I., Webb D. R. Antigen-stimulated changes in cyclic nucleotide levels in the mouse (antigenic stimulation/splenic cyclic nucleotides/prostaglandins).—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, p. 2320—2324.

VI

МИКРООКРУЖЕНИЕ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ КАК ФАКТОР ИММУНИТЕТА

Жизненный цикл иммунокомпетентных клеток лимфоидной ткани (В- и Т-клетки и их потомки в виде клеток, синтезирующих иммуноглобулины и антигенраспознающие и эффекторные лимфоциты) существенно короче, чем время жизни организма. В связи с этим ведущим условием для осуществления иммунологических реакций служит постоянное протекание в лимфоидной ткани гистогенезов, в ходе которых происходят пролиферация предшественников иммунокомпетентных клеток и их дифференцировка в зрелые клетки. Последние, как правило, высокоспециализированы и гетерогенны, а дифференцировочные различия, связанные с иммунологическими функциями, у них жестко закреплены (класс и специфичность синтезируемого иммуноглобулина у В-клеток и специфичность рецепторов для антигенов у Т-клеток). Наоборот, среди клеток-предшественников в течение всей жизни присутствуют и такие, для которых открыты несколько возможностей дифференцировки (Фриденштейн, Чертков, 1969).

Орган иммунитета — лимфоидная ткань — имеет еще одну важную особенность. Большинство его клеток-предшественников относится к подвижным, рециркулирующим элементам. Они образуются в местах, отделенных от тех, куда они затем мигрируют и где образуют потомство зрелых клеток (Чертков, Фриденштейн, 1977).

Таким образом, процессы, которые во многих других тканях осуществляются лишь в момент их закладки при морфогенезе, в лимфоидной ткани протекают всю жизнь. Они обеспечивают постоянное изменение ее клеточного состава, набора синтезируемых иммуноглобулинов (антител) и типов иммунологически активных лимфоцитов в соответствии с меняющимся спектром антигенов, поступающих в лимфоидную ткань.

На лимфоидной ткани удалось убедительно показать (Бернет, 1971), что эти изменения осуществляются главным образом или даже исключительно путем селекции коммитированных клеток-предшественников, преддетерминированных к последующей дифференцировке безотносительно к воздействию антигенов. Таким образом, в дифференцировке лимфоидных клеток во взрослом организме естественно выделяются два этапа: развитие антигеннезависимых предшественников и антигензависимая дифференцировка их потомков. Первый этап начинается с общей стволовой кроветворной клетки и оканчивается коммитированными предшественниками. Неизвестно, однако, в какой последовательности происходят при этом стадии разделения на Т- и В-предшественники, на предшественники, различные по иммунологической специфичности и по классам синтезируемых иммуноглобулинов, а также по принадлежности к разным субпопуляциям Т-клеток. Результаты, полученные при использовании трансплантации костномозговых клеток, маркированных пострадиационными хромосомными перестройками

(Abramson e. a., 1977), показали, в частности, что в костном мозге содержатся стволовые клетки, способные к самоподдержанию, но имеющие ограниченные дифференцировочные потенции, — например, такие, которые дифференцируются только в миелоидные или только в Т-клетки. При этом не обнаружилось пока стволовых клеток, лишенных потенций к миелоидной дифференцировке, но сохранивших свойство быть предшественниками одновременно и для Т- и для В-клеток. Можно поэтому предполагать, что самоподдерживающиеся предшественники Т-клеток (претимические стволовые клетки) прямо происходят из полипотентных стволовых кроветворных клеток, не проходя стадии предшественника, общего для всех лимфоидных клеток. Что касается В-клеток, то между ними и стволовыми кроветворными клетками, возможно, нет вообще предшественников, способных к самоподдержанию.

Вопрос о механизмах, действующих при образовании коммитированных предшественников и регулирующих экспрессию в них генов, ответственных за иммунологические функции, остается открытым. Есть веские основания считать, что этот важный этап развития иммунокомпетентных клеток является антигеннезависимым. Наоборот, последующее развитие уже коммитированных клеток и их потомков отчетливо антигензависимо. Оно обеспечивает изменение клеточного состава лимфоидной ткани путем преимущественного размножения и дифференцировки тех предшественников, чьи поверхностные рецепторы распознают присутствующие в ней в данный момент антигены. Другой механизм избирательной пролиферации коммитированных предшественников связан с клеточными взаимодействиями, при которых активированная антигеном клетка стимулирует соседние с ней клетки-предшественники. И в том и в другом случае антигены выступают как инициаторы изменения состава клеточных популяций населяющих лимфоидную ткань, и как индукторы синтезируемых этой тканью белков.

Прохождение иммунокомпетентными клетками антигензависимых и антигеннезависимых стадий развития происходит в разных органах (Фриденштейн, Чертков, 1969). Уже это обстоятельство указывает на разницу условий, нужных для прохождения этих стадий. Такие условия далеко не исчерпываются действием антигенов. Они в значительной степени являются результатом взаимодействия между субпопуляциями самих лимфоидных клеток, а также лимфоцитов с нелимфоидными клетками кроветворных органов — макрофагами и стромальными механицидами.

Лимфоидные клетки и их клетки-предшественники обеспечиваются в органах лимфопоэза нужным для пролиферации, дифференцировки и для распознавания антигенов микроокружением. Микроокружение отличается не только один лимфоидный орган от другого, но и отдельные участки внутри каждого органа. Оно определяет возможность заселения данной территории либо Т-, либо В-клетками, возможность развития на ней либо антителопродуцирующих клеток, либо иммунных лимфоцитов и, наконец, способствует распознаванию антигенов иммунокомпетентными клетками. Микроокружение, насколько сейчас известно, создают клетки, лишенные иммунологической компетентности. Их воздействие на антигензависимые стадии развития лимфоидных клеток может, поэтому, носить поликлональный характер, т. е. распространяться не только на те клетки, рецепторы которых комплементарны к присутствующим в данный момент в лимфоидной ткани антигенам. Тем не

менее факторы микроокружения не препятствуют, а, наоборот, обеспечивают возможность преимущественного развития тех лимфоидных клеток, от которых зависит специфичность иммунологических реакций на данный антиген.

VI.1. РЕПОПУЛЯЦИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И ЗАСЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТАМИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ

С функциональной и гистогенетической точки зрения клетки лимфоидной системы могут быть разделены на три отдела (компартамента): 1) стволовые кроветворные клетки костного мозга; 2) клетки-предшественники первичных лимфоэпителиальных органов, зачатки которых закладываются в местах стыковки кишечного эпителия с эктодермальным эпителием жаберных карманов (тимус) или клоаки (фабрицева сумка); 3) лимфоидные клетки вторичных лимфоидных органов (лимфоузлов и селезенки), зачатки которых имеют мезодермальное происхождение (Miller, 1974). Первичные и вторичные лимфоидные органы, хотя и образуют систему, объединенную интенсивными клеточными миграциями, имеют ряд существенных различий. В частности, митотическая активность лимфоидных клеток на территории первичных лимфоидных органов антигеннезависима, а во вторичных лимфоидных органах она стимулируется антигенами (Фриденштейн, Чертков, 1969). Гистогенез плазматических клеток и формирование центров размножения имеет место только во вторичных, но не в первичных лимфоидных органах. Первичные лимфоидные органы популируются только стволовыми клетками или их иммунологически некоммитированными потомками (Бернет, 1971); вторичные лимфоидные органы популируются коммитированными иммунокомпетентными клетками: Т-клетками (потомки тимоцитов) и В-клетками (потомки клеток фабрицевой сумки у птиц и ее аналогов у млекопитающих).

Образование Т-клеток в тимусе происходит из потомков костномозговых стволовых кроветворных клеток (Фриденштейн, Чертков, 1969; Bash, Kadish, 1977). Эмигрируя из костного мозга, они попадают по току крови в тимус и проникают в его ткань в области коркового слоя. В тимусе они активно пролиферируют и подвергаются дифференцировке и коммитированию (Бернет, 1971). Их потомки перемещаются в корковый слой и либо гибнут внутри тимуса, либо покидают его, вновь поступая в кровотоки. Стадии дифференцировки, которые претерпевают предшественники Т-клеток в тимусе, имеют антигенные, функциональные и морфологические маркеры. Наименее зрелые предшественники характеризуются высокой чувствительностью к кортизону, высокой концентрацией антигенов TL и Ly и низкой концентрацией H₂-антигенов. Морфологически эти клетки являются малыми лимфоцитами, содержащими монорибосомы и относительно мало органоидов. Они дают начало пролиферирующим в тимусе большим лимфоцитам с резко увеличенным количеством рибосом, собранных в полисомы в виде розеток. Наиболее зрелые в пределах тимуса Т-клетки находятся в его мозговом слое. Они резистентны к кортизону, имеют малые концентрации TL- и θ-антигенов, но много H₂-антигена. Морфологически — это малые

лимфоциты, но содержащие полирибосомы и волокнистые цитоплазматические структуры. Таких клеток в тимусе содержится около 5% от всех тимоцитов, и именно они могут выходить из тимуса в кровотоки и осуществлять колонизацию периферических лимфоидных органов в качестве антигенраспознающих, уже коммитированных Т-клеток. Окончательное дозревание Т-клеток происходит только после их попадания во вторичные лимфоидные органы. Гибель подавляющей части тимоцитов внутри тимуса позволяет предполагать, что избыточная пролиферация в нем Т-предшественников связана с апробированием их свойств и отбором еще до встречи с антигенами; последние практически не попадают в тимус благодаря наличию специального барьера.

При заселении тимуса предшественниками Т-клеток ориентирами для них служат не лимфоциты (timoциты) и не макрофаги (которые в тимусе крайне малочисленны), а клетки его стромы. На это указывают результаты типирования клеток в гетеротопных трансплантатах тимуса (Дидух, Фриденштейн, 1970). Стромальные клетки тимуса — ретикулярные клетки, или клетки его эктодермального эпителия, — создают и то микроокружение, которое необходимо для дифференцировки Т-клеток: в отсутствие тимической стромы Т-клетки в организме не образуются. Однако результаты, полученные на радиохимерах и при гетеротопной трансплантации тимуса, показали, что свойства образующихся в тимусе Т-клеток определяются генетической структурой заселяющих его предшественников, а не стромальными клетками, образующими территорию, на которой происходит их дифференцировка. Действительно, в случаях, когда тимэктомизированный реципиент и донор тимуса, используемого для гетеротопной трансплантации, различаются по θ -антигенам, тимоциты, которые образуются в пересаженном тимусе, имеют θ -антиген реципиента, а в случае, когда по θ -антигенам различаются донор клеток костного мозга и облученный реципиент, тимоциты радиохимеры имеют θ -антиген донора (Metcalf, Mooge, 1971). Это показывает, что роль тимического микроокружения как индуктора образования Т-клеток состоит в создании возможности для реализации тех генетически закодированных в потомках стволовых кроветворных клеток свойств, которые характеризуют дифференцировку Т-клеток. Важный фактор тимического микроокружения — это секретируемый его стромальными клетками полипептид — тимозин (м. в. 35 000). Тимозин индуцирует созревание Т-клеток из костномозговых предшественников (в частности, синтез θ -антигена) как *in vivo*, так и *in vitro* (Scheid e. a., 1973). Исчерпывается ли специфическое действие тимического микроокружения секрецией тимозина, пока не выяснено (Werkle e. a., 1973).

Предшественники В-клеток образуются у птиц в фабрициевой сумке из иммигрирующих в нее из костного мозга потомков стволовых кроветворных клеток, а у млекопитающих возникают в самом костном мозге или, возможно, в лимфоидных органах стенки кишечника (таких, как аппендикс и пейеровы бляшки). В виде уже коммитированных иммунокомпетентных предшественников В-клетки поступают в кровотоки и заселяют периферические лимфоидные органы: лимфоузлы и селезенку (Фриденштейн, Чертков, 1969).

Колонизация периферических лимфоидных органов сопровождается массивной рециркуляцией лимфоцитов — своеобразным процессом, в ходе которого лимфоциты, выйдя через мелкие артериолы лимфоидных

органов, могут вновь попасть в кровяное русло. Для этого они должны проникнуть в отводящие лимфатические сосуды тех же органов, чтобы затем попасть в венозную кровь или пройти непосредственно через стенки венул лимфоузлов (Hall, 1974). Введение меченых лимфоцитов показало, что у крыс уже за один час все малые лимфоциты крови выходят в лимфоузлы, но затем большая их часть вновь появляется в крови. При рециркуляции лимфоциты многократно проделывают путь: лимфа — кровь — лимфоузлы — лимфа. Время, которое затрачивается лимфоцитами крыс на траверз ткани лимфоузлов (т.е. от момента выхода из кровяного русла до поступления в общий грудной лимфатический проток) составляет от 14 до 36 час. Оно различно для тех лимфоцитов, которые находятся в состоянии активного синтеза РНК, и тех, которые РНК не синтезируют и проделали последний клеточный цикл около двух недель назад. Траверз лимфоцитов резко усиливается в лимфоузлах, стимулированных антигенным раздражением (Hay, Hobbs, 1977).

Репопуляция лимфоцитов обеспечивает им возможность многократного прохождения через ткань лимфоузлов, что, очевидно, важно для неслучайного заселения. Действительно, Т-клетки заселяют Т-зависимые зоны, а В-клетки — В-зависимые зоны, которые находятся рядом на территории каждого лимфоузла, но нельзя их путать с лимфоцитами (Бернет, 1971). Возникает вопрос, что распознается лимфоцитами как ориентир подходящего для заселения места. Речь идет, очевидно, не только об эндотелии тех сосудов, через стенки которых выходят лимфоциты (Stamper, Woodruff, 1976), — иначе они не должны были бы проделывать свободный траверз ткани лимфоузлов. Можно также показать, что лимфоциты при заселении ориентируются не на лимфоциты и не на макрофаги. Об этом свидетельствует восстановление структуры лимфоузлов после их гетеротопной трансплантации (в том числе, когда пересаживаются предварительно облученные лимфоузлы). Регенерация происходит, как это показывают антигенные и хромосомные маркеры (Дидух, Фриденштейн, 1970), за счет заселения трансплантатов лимфоцитами реципиента, которые в момент их проникновения на территорию трансплантированного облученного лимфоузла не находят там ни лимфоидных клеток, ни макрофагов. В то же время в результате гетеротопной трансплантации от донора переносится строма лимфоидного органа. Ее клетки, очевидно, и служат ориентирами, которые распознаются при популяции вторичных лимфоидных органов.

VI.2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ ВО ВТОРИЧНЫХ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНАХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА АНТИТЕЛОПРОДУЦИРУЮЩИХ КЛЕТОК

На примере введения белковых антигенов может быть легко продемонстрирована гетерогенность территории лимфоузлов как плацдарма, на котором лимфоциты распознают антигены и дифференцируются в антителопродуцирующие клетки. Локализация меченых радиоизотопами антигенов характерным образом изменяется в лимфоузлах по срокам после их введения (Hanna, Szaval, 1968; Nossal *et al.* 1968). После под-

кожного введения антиген накапливается в регионарных лимфоузлах. Уже через 5 мин он обнаруживается в макрофагах, выстилающих синусы мозгового слоя лимфоузла, а через 24 часа перемещается в корковый слой. Здесь антиген располагается в ретикулярных клетках, лежащих на границе тимусзависимых и тимуснезависимых зон, а именно вблизи вторичных фолликулов. Содержащие антиген дендритические ретикулярные клетки имеют длинные цитоплазматические отростки, на наружной клеточной мембране которых и располагаются молекулы антигена. Как антиген из макрофагов мозгового слоя передается в ретикулярные клетки коркового слоя, остается неизвестным. К длинным отросткам ретикулярных клеток, содержащих антиген, подходят лимфоциты, а так как это происходит на границе тимусзависимых и тимуснезависимых областей, то естественно предположить, что распознавание антигена и кооперация Т- и В-клеток происходит именно в этих местах и что в ней участвуют дендритические клетки, репрезентирующие антиген, предварительно обработанный макрофагами. На периферии вторичных фолликулов, т. е. в непосредственном контакте с содержащими антиген ретикулярными клетками, происходит образование наиболее ранних в гистогенетическом ряду клеток, синтезирующих антитела. На 3-й день здесь обнаруживаются антителопродуцирующие плазмобласты, в которых синтезируются IgM-антитела. Клональный характер развития этих клеток из родоначальных В-клеток предшественников твердо доказан. В случае тимусзависимых антигенов для начала пролиферации и дифференцировки этих клоногенных В-предшественников требуется их активация не только антигеном (через поверхностный рецептор в виде молекул встроенного в наружную клеточную мембрану иммуноглобулина), но и стимуляция со стороны активированной антигеном Т-клетки (Miller, 1974). Стимуляция осуществляется короткодистантным гуморальным фактором, который понижает порог чувствительности В-клетки к действию антигена.

Начавшая пролиферацию и дифференцировку В-клетка претерпевает первые шесть митотических делений, находясь в корковом слое лимфоузла, затрачивая по 6—9 час на каждый митотический цикл. В результате образуется около 60 плазмобластов, продолжающих синтезировать IgM-антитела сравнительно низкой авидности; интенсивность синтеза иммуноглобулинов в плазмобластах невелика. Следующие этапы своего развития потомки клоногенных клеток претерпевают уже не в корковом, а в мозговом слое лимфоузлов. Часть плазмобластов мигрирует при этом в мязовые шнуры и, продолжая размножаться на их территории, претерпевает еще 2—4 деления, в результате которых образуется 250—1000 юных плазматических клеток, которые затем дифференцируются в уже неделящиеся зрелые плазматические клетки, срок жизни которых составляет около 48 час (Nossal, 1962). Синтез антител в юных, и особенно в зрелых плазматических клетках, происходит с гораздо большей интенсивностью, чем в плазмобластах, — около 10^7 молекул иммуноглобулина в час. Иммунологическая специфичность этих секретируемых антител соответствует специфичности иммуноглобулиновых рецепторов, синтезируемых исходной В-клеткой (с интенсивностью 10^4 рецепторных молекул в час).

Однако в ходе дифференцировки плазмобласта в зрелую плазматическую клетку изменяется не только интенсивность синтеза иммуноглобулинов. Начиная с 4-го дня развивающиеся клоны синтезируют не

IgM-, а IgG-антитела. Происходит ли при этом переключение синтеза внутри тех же клеток или в составе клона рекрутируются новые антителопродуцирующие клетки из числа потомков клоногенных клеток, ранее не синтезировавших антитела, остается неясным. Кинетические данные о нарастании числа IgM- и IgG-продукторов в ходе иммунного ответа хорошо согласуются с гипотезой о переключении (шифт) (Nossal, 1974). В то же время, наблюдения за развитием клонов плазматических клеток в агаровых культурах *in vitro* пока эту гипотезу не подтверждают (Metcalf *et al.*, 1975).

Помимо перехода с синтеза IgM- на синтез IgG-антител, зрелые плазматические клетки продуцируют антитела с гораздо большей авидностью, чем плазмобласты. Это свойство антител имеет решающее биологическое значение, но, к сожалению, остается пока неясным, каким образом члены одного клона изменяют («уточняют») специфичность синтезируемых антител. Весьма вероятно, что это происходит в связи с изменением места, где эти клетки проходят свою дифференцировку, — с их перемещением из коркового слоя в мозговой слой лимфоузла, т. е. со сменой микроокружения. Можно предположить, что микроокружение мягкотканых шнуров индуцирует синтез IgG-антител и увеличение их авидности, тогда как микроокружение коркового слоя обеспечивает антигенное распознавание и кооперацию Т- и В-клеток, т. е. начальные стадии развития клонов антителопродуцирующих плазматических клеток.

VI.3. УЧАСТИЕ НЕЛИМФОИДНЫХ А-КЛЕТОК В ИММУНОЛОГИЧЕСКОМ ОТВЕТЕ *IN VITRO*

Воспроизведение первичного синтеза антител потомками В-клеток в суспензионных культурах позволило установить, что, помимо кооперации с Т-клетками, необходимо, чтобы в таких культурах осуществлялось взаимодействие еще с одной категорией клеток, а именно с высокоадгезивными А-клетками нелимфоидной природы (Mosier, 1967; Упанье, 1972). Клетки селезенки мышей могут быть разделены на две популяции. Одна обладает способностью крепиться к стеклу и пластику после получасовой инкубации в культуральной среде при 37° С (А-клетки). Адгезивные способности другой популяции, включающей Т- и В-клетки, выражены в значительно меньшей степени. Раздельное культивирование адгезивных и неадгезивных клеток с антигеном резко снижает уровень антителообразования, а при их объединении проявляется выраженный синергизм в антителообразовании.

А-клетки, с одной стороны, и Т- и В-клетки — с другой, резко различаются по радиочувствительности: способность А-клеток участвовать в антителообразовании не снижается после облучения 2000 Р, в то время как неприлипающие клетки высоко радиочувствительны. Они имеют и различную чувствительность к актиномицину D, причем чувствительность А-клеток выше, чем неприлипающих (Упанье, 1972).

Обработка А-клеток анти-θ-сывороткой не отменяет их активности при объединении с неприлипающими клетками, а анализ фенотипов антителообразующих клеток в системе, где доноры прилипающих и неприлипающих клеток различались по H-2-локусу, показал, что гемолизин-продуцирующие клетки происходят от донора неприлипающих клеток. Таким образом, А-клетки не относятся ни к Т-, ни к В-клеткам.

Кроме А-клеток селезенки, способность взаимодействовать с неприлипающими клетками при синтезе антител имеют клетки перитонеального экссудата, а также радиорезистентные клетки лимфоузлов, но не тимуса и костного мозга. Морфологический анализ показывает, что главным клеточным компонентом популяции А-клеток являются макрофаги (80—90%). Используя лимитирующие разведения, удалось убедиться, что популяция А-клеток неоднородна, активными в смысле кооперации с неприлипающими клетками являются лишь 10^{-3} — 10^{-4} клеток из всех А-клеток (Mosier, Coppleson, 1968).

Пока не вполне ясно, нужен ли непосредственный контакт А-клеток с неприлипающими клетками или А-клетки выделяют активирующий фактор в среду. Есть данные, что отделение А-клеток миллипорным фильтром снимает их активность (Упапе, 1972) и, наоборот, что среда из культур А-клеток обладает активностью (Möller e. a., 1976). Показано (Calderon e. a., 1975), что среда из культур макрофагов содержит вещество, чувствительное ко пепсину и хемотрипсину с молекулярным весом 15 000—21 000, которое стимулирует образование IgM- и IgG-антител в культурах, увеличивает синтез ДНК тимocyтами. Морфологическим субстратом взаимодействия А-клеток с неприлипающими клетками служат, очевидно, клеточные скопления, обычно образующиеся в суспензионных культурах и состоящие из единичных макрофагов, окруженных лимфоидными и плазматическими клетками. Манипуляции, предотвращающие образование таких скоплений, приводят к резкому снижению иммунного ответа. Ультроструктурный анализ скоплений выявил тесные межклеточные контакты лимфоцитов друг с другом и с макрофагами, что может указывать на наличие специфических микроусловий, обеспечивающих взаимодействие Т- и В-лимфоцитов с А-клетками и антигеном (Упапе, 1972). Антигензависимое прилипание лимфоцитов к макрофагам удается воспроизвести *in vitro* (Lipsky, Rosenthal, 1975).

Является ли А-зависимым антителообразование ко всем антигенам, остается не вполне ясным. Существуют данные, что на поверхности А-клеток создается упорядоченная структура повторяющихся антигенных детерминант, необходимая для вовлечения в иммунный ответ лимфоидных клеток, и что Т-независимые антигены с повторяющимися детерминантами (такие, как полимеризованный флагеллин из *Salmonella adelaideae*) не нуждаются в помощи А-клеток (Feldman, Nossal, 1972). Впрочем, есть данные (Möller e. a., 1976), что культуральная среда из-под А-клеток так же активно действует на антителообразование, как и сами А-клетки, и что ответ на Т-независимые антигены также требует участия А-клеток.

Индукция *in vitro* реакций замедленной повышенной чувствительности, за которую ответственны Т-лимфоциты, также нуждается в участии А-клеток. Такие звенья этой реакции, как антигензависимая пролиферация сенсibilизированных лимфоцитов (Упапе, 1972; Rosenthal, Shevach, 1973; Schilling e. a., 1976), а также бласттрансформация в смешанных культурах лимфоидных клеток и образование лимфоцитов с цитотоксическими свойствами, являются А-зависимыми. Неоднократно была продемонстрирована необходимость присутствия А-клеток для пролиферации лимфоцитов тимусного происхождения в ответ на специфические для Т-клеток митогены.

Основным звеном в кооперации А-клеток и неприлипающих клеток следует считать взаимодействие А-клеток с тимуспроизводными лимфо-

цитами. Вопрос о возможности замены прилипающих клеток в культурах *in vitro* различными веществами (например, липополисахарид из *Escherichia coli* или 2-меркаптоэтанол), по-видимому, решается отрицательно, хотя в таких культурах эффект от удаления А-клеток и понижается (Bevan *et al.*, 1974).

Несмотря на обширный экспериментальный материал, который уже накоплен, конкретные функции А-клеток в иммунологических реакциях *in vitro* остаются неясными. Дело осложняется тем, что в разных реакциях и при различных системах культивирования эти функции могут не совпадать. При антителиообразовании на разные антигены, при реакциях замедленной повышенной чувствительности и при действии митогенов, а также при использовании разных клеточных популяций (в том числе при разной плотности клеток в культурах) регулирующая роль А-клеток может зависеть от разных причин.

Наименее правдоподобно, что роль А-клеток сводится к переработке фагоцитируемого ими антигена, созданию суперантигена. Этому противоречит, в частности, то обстоятельство, что блокада фагоцитарной активности макрофагов не угнетает функции А-клеток. Во многих случаях А-клетки способствуют выживанию лимфоидных клеток в культурах, реализации между ними клеточных контактов и тем стимулируют их пролиферацию. Эта активность А-клеток приводит к поликлональной, а не избирательной стимуляции иммунокомпетентных клеток. А-клетки, как предполагается, могут фокусировать на своей поверхности антигены, введенные в культуру, и таким образом облегчить их восприятие Т-клеткам, а также специфическую кооперацию последних с соответствующими В-клетками. Несмотря на отсутствие иммунокомпетентности у А-клеток (А-клетки от толерантных и иммунных доноров проявляют такую же активность, как от нормальных доноров), такого рода подготовка антигена может приводить уже не к поликлональной стимуляции, а к активации именно тех клеток, которые компетентны к присутствующим в культурах антигенам. Не исключено, что А-клетки, подготавливая антиген и участвуя в клеточных кооперациях, регулируют соотношение Т-хелперных и Т-супрессорных клеток в культурах или регулируют качество того сигнала, который антиген вызывает в иммунокомпетентных клетках, подобно тому, как это наблюдается при индукции в популяциях лимфоидных клеток синтеза ДНК при разных концентрациях конконавалина А (McClain, Edelman, 1976).

Генетический анализ взаимодействия А-клеток и лимфоцитов в ходе антигениндуцированной пролиферации сенсibilизированных лимфоцитов *in vitro* выявил необходимость совпадения макрофагов и Т-клеток по генам гистосовместимости (Rosenthal, Shevach, Katz, Benacerraf, 1975). То же справедливо и для взаимодействия макрофагов с Т-клетками *in vivo* (Biller *et al.*, 1976). Участие А-клеток необходимо для образования Т-хелперных клеток при индукции антителиообразования и на растворимые, и на корпускулярные антигены. Однако в первом случае требуется совпадение макрофагов и Т-клеток по генам H-2-комплекса (в особенности I-A-района, в котором находится и часть I-g-генов), тогда как во втором достаточно присутствия и аллогенных А-клеток (Erg, Feldman, 1975). Следует предполагать, что взаимодействие А- и Т-клеток осуществляется с участием рецепторов, кодируемых генами гистосовместимости, создающими разнокачественность своего и чужого, и что продукты этих генов близки или во всяком случае эволюционно родствен-

ны продуктам V-геинов, ответственных за иммунологическую разнокачественность иммуноглобулинов и клеточных рецепторов.

Вопрос о морфологической принадлежности клеток, с которыми связана активность популяции А-клеток, до сих пор не решен. Эта популяция в высокой степени гетерогенна и по способности фиксировать антигены, и по морфологии и происхождению входящих в ее состав клеток. Как уже указывалось, лишь незначительная часть клеток А-популяции является функционально активной при взаимодействии с неприлипающими клетками, число таких функционально активных клеток составляет от 1 до 10 на 10 000 прилипающих клеток (Mosier, Coppelson, 1968), причем их распределение во фракциях клеток селезенки, разделенных в градиенте концентраций бычьего сывороточного альбумина, не соответствует распределению макрофагальных фагоцитирующих элементов (Upanue, 1972). Наиболее существенным доводом в пользу макрофагальной природы А-клеток считается их инактивация антимacroфагальной сывороткой. Однако такие сыворотки готовятся иммунизацией не чистыми макрофагами, а всеми прилипающими клетками, т. е. А-клетками. Поэтому инактивация этими сыворотками функции А-клеток не может считаться доказательством того, что А-клетки являются именно макрофагами. Все это лишает убедительности соображения о том, что функции А-клеток обеспечиваются просто клетками с высокой фагоцитарной активностью, т. е. макрофагами, хотя они действительно являются преобладающей формой в А-популяции. Следует, очевидно, искать среди А-клеток действительно активные, но уникальные субпопуляции.

В монослойных культурах лимфоидных органов мышей выделены высокоадгезивные короткоживущие дендритические клетки, составляющие около 1% клеточного состава этих органов и охарактеризованные как находящиеся вне пролиферативного пула нефагоцитирующие клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов и макрофагов (Seipman e. a., 1974). Эти клетки видимым образом не связывают антигены и комплексы антиген — антитело, и оказывают ли они влияние на лимфоидные клетки, остается пока неизвестным. Другая субпопуляция прилипающих клеток — это стромальные механоциты. Их концентрация среди А-клеток (10^{-3} — 10^{-4}) хорошо соответствует концентрации активных А-клеток, а добавление стромальных механоцитов в культуры клеток селезенки оказывает заметное действие на антителообразование. Однако прямых данных ни о роли стромальных механоцитов, ни дендритических клеток в качестве А-клеток пока не получено.

Какими бы ни оказались по морфологии А-клетки, ясно, что та роль, которую они исполняют в иммунологических реакциях *in vitro*, относится к числу функций микроокружения периферических лимфоидных органов: представление антигена антигенреактивным клеткам; обеспечение взаимодействия антигена с соответствующими лимфоидными предшественниками; регулирование тимусзависимых, клеточнообусловленных иммунных ответов и тимуснезависимых, гуморальных иммунных ответов; обеспечение взаимодействия двух частей иммунной системы за счет возрастания вероятности взаимодействия Т- и В-лимфоцитов в тимусзависимых ответах (Metcalf, Moore, 1971). Поэтому активная субпопуляция А-клеток должна, очевидно, составлять часть того микроокружения, которое действует на территории лимфоидных органов и которое особенно существенно для прохождения антигензависимых стадий дифференцировки иммуокомпетентных клеток.

VI.4. КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ СТРОМАЛЬНЫХ МЕХАНОЦИТОВ, ПЕРЕНОСЯЩИЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ, И ИХ КЛОНОГЕННЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ

При эксплантации в монослойные культуры суспензий клеток кроветворных и лимфоидных органов от взрослых мышей, крыс, морских свинок, собак, а также людей возникают колонии фибробластов, а при их пассивировании — диплоидные штаммы фибробластов (Фриденштейн и др., 1970; Friedenstein, 1976). Штаммы фибробластов, происходящие из костного мозга, селезенки, тимуса, лимфоузлов или клеток перитонеальной полости, по своим морфологическим характеристикам почти не различаются. В то же время они представляют собой клеточные линии механоцитов, которые существенно различаются по гистогенетическим свойствам и, что особенно важно, по способности создавать разное микроокружение. В этом убеждают опыты с обратной трансплантацией таких клеток в организм.

Действительно (Фриденштейн и др., 1970, 1973), когда фибробласты из культур костного мозга, прошедшие 20 пассажей, помещают в диффузионные камеры, развивается интенсивный остеогенез и камеры полностью зарастают костью; в то же время фибробласты из культур селезенки при обратной трансплантации образуют в диффузионной камере ретикулярную ткань. При свободной трансплантации костномозговых фибробластов на месте пересадки образуется косточка, заполняющаяся костным мозгом, а на месте селезеночных фибробластов — небольшой лимфоидный орган. Таким образом, подсадка чистых штаммов стромальных фибробластов приводит к таким же результатам, как и гетеротопная трансплантация фрагментов кроветворных и лимфоидных органов, — прием, служащий для переноса микроокружения от донора к реципиенту (Чертков, Фриденштейн, 1977). И в том и в другом случае пересаженные стромальные механоциты (в виде чистого клеточного штамма или в составе ткани) распознаются кроветворными и лимфоидными клетками реципиента как территории, подходящие для заселения. Микроокружение, создаваемое в гетеротопном трансплантате, допускает реализацию тех дифференцировок, которые осуществляются кроветворными и лимфоидными клетками на территории исходного для перенесенных механоцитов органа. В частности, в гетеротопных трансплантатах тимуса кроветворные клетки реципиента развиваются в Т-клетки, в трансплантатах костного мозга — в миелоидные и эритроидные клетки, а в гетеротопных трансплантатах селезенки дифференцировка клеток реципиента идет в тех же направлениях, что и в селезенке донора (Metcalf, Moore, 1971; Чертков, Фриденштейн, 1977). Все это показывает, что роль стромальных механоцитов как клеток, создающих микроокружение, заключается в «разрешении» для кроветворных клеток реализовать определенные из возможных для них дифференцировок.

Клеточные линии стромальных механоцитов кроветворных и лимфоидных органов гистогенетически независимы от кроветворных и лимфоидных клеток, а также от макрофагов. Это доказали исследования с типированием клеток по иммунологическим (антигенным), хромосомным и ядерным маркерам, проведенные на гетеротопных трансплантатах у радиохимер и парабионтов (Фриденштейн, Лалыкина, 1973; Friedenstein, 1976). Следовательно, у взрослых млекопитающих и птиц нет общих

клеток-предшественников для стромальных механоцитов (так же как и для других категорий механоцитов, включая фибробласты подкожной клетчатки), с одной стороны, и кроветворных и лимфоидных клеток — с другой. И если обновление кроветворных и лимфоидных клеток обеспечивается общей линией стволовых кроветворных клеток, то стромальные клетки разных органов обеспечены своими местными стволовыми клетками. Эти клетки способны к длительному самоподдержанию, и в частности к образованию пассируемых клеточных штаммов фибробластов.

Штаммы стромальных механоцитов, переносящие микроокружение, возникают из клеток, образующих колонии фибробластов (КОКФ) при первичной эксплантации. Другими словами, КОКФ являются представителями линий механоцитов, различных в разных кроветворных органах. Они относятся к категории длительно самоподдерживающихся клеток-предшественников стромальной ткани, ответственных за особенности микроокружения, действующего на территории разных кроветворных органов. Костномозговые стромальные механоциты обладают, как известно, выраженными остеогенными потенциями и выступают одновременно и как остеогенные клетки-предшественники (Фриденштейн, Лалыкина, 1973).

Клонирование *in vitro* стромальных предшественников позволяет выяснить ряд свойств, которые характеризуют клетки, создающие микроокружение. Само клонирование осуществляется в монослойных культурах при начальной клеточной плотности в пределах 10^4 — 10^5 см² (Лурья, 1972; Фриденштейн, Лалыкина, 1973; Чертков, Фриденштейн, 1977).

Формирование колоний фибробластов начинается с 3—4-го дня после эксплантации, когда они состоят из нескольких клеток. К 10-му дню колонии достигают размеров до 0,5—0,8 см в диаметре и насчитывают по несколько тысяч клеток. Между 5-м и 12-м днями культивирования число колоний не возрастает, увеличивается лишь размер практически каждой колонии.

Клетки, составляющие колонии, представляют собой типичные фибробласты, с невысокой активностью щелочной фосфатазы и многочисленными лизосомами, богатыми кислой фосфатазой. По форме колоний и упаковке в них клеток имеются значительные различия в пределах каждой культуры, что, очевидно, указывает на разнокачественность колониеобразующих клеток в пределах одной популяции. Результаты типирования клеток в колониях, вырастающих при эксплантации смеси клеток, различающихся по хромосомным маркерам, линейная зависимость числа колоний от количества эксплантированных клеток и прижизненные наблюдения за развивающимися колониями показали, что колонии фибробластов являются клеточными клонами (Фриденштейн и др., 1970; Friedenstien, 1976).

Морфологически колониеобразующие клетки в первые часы эксплантации имеют вид мононуклеарных элементов; спустя сутки они приобретают вытянутую форму и овальное светлое ядро с выступающим ядрышком, т. е. признаки фибробластоподобных клеток. Свой первый S-период *in vitro* они проходят между 28 и 60 час после эксплантации. Митотический цикл фибробластов в колониях составляет около 20 час, а пролиферативный пул — 80—100% (Friedenstien, 1976). Эффективность образования колоний фибробластов отражает концентрацию стромальных предшественников среди кроветворных и лимфоидных клеток, поэтому

клонирование в монослойных культурах может использоваться для оценки изменения содержания этих клеток под влиянием различных факторов, для сравнительного определения количества этих клеток в различных клеточных популяциях, а также для изучения свойств стромальных клеток-предшественников (например, радиочувствительности, отношения к веществам, действующим на различные фазы клеточного цикла, и т. д.).

КОКФ костного мозга относятся к медленно пролиферирующим клеткам. Находясь в составе костного мозга 6- и 14-дневных морских свинок, лишь 15 и 2% из них метятся ^3H -тимидином за 72 часа. У взрослых животных все стромальные предшественники остаются немечеными и не погибают в результате самоубийства при инкубации с ^3H -тимидином высокой удельной активности. В этом отношении они четко отличаются от кроветворных клеток, лимфоцитов и предшественников макрофагов. Содержание КОКФ в кроветворных органах с возрастом характерным образом изменяется (Friedenstein, 1976).

Клоногенные предшественники фибробластов присутствуют в относительно большой концентрации среди клеток брюшной и плевральной полостей. Их число (на 10^5 клеток) составляет в первой около 8, а во второй — около 27.

КОКФ костного мозга и тимуса относятся к категории быстро прилипающих к поверхности стекла клеток. В отсутствие сыворотки время, нужное для прикрепления 90% КОКФ, составляет 90 мин, причем большинство из них прикрепляется к стеклу уже в первые 30 мин (Friedenstein, 1973). Потомки КОКФ активно синтезируют коллаген. Это относится к КОКФ костного мозга, селезенки и тимуса.

Данные о радиочувствительности стромальных клеток-предшественников, полученные разными методами, практически совпадают. Радиочувствительность КОКФ костного мозга и селезенки морских свинок, которая определялась по степени подавления колониеобразования после облучения клеток *in vitro*, характеризуется величиной $D_{50}=178 \text{ P}$ и $n=1,4$ (Friedenstein, 1973). Сходную радиочувствительность обнаруживают и КОКФ костного мозга человека. Радиочувствительность КОКФ костного мозга мышей характеризуется D_{50} порядка 220 P. Такая же величина D_{50} была получена для клеток из плевральной полости мышей, образующих колонии фибробластов в агаровых культурах (Чертков, Фриденштейн, 1977).

Методом клонирования стромальных клеток-предшественников *in vitro* было показано, что число КОКФ резко возрастает в регионарном лимфоузле после первичного введения антигена: в 30 раз через одни сутки, в 40 раз — через 7 сут; через месяц оно возвращается к исходному уровню. В контррегионарном узле также происходит увеличение числа КОКФ, но оно менее выражено и наступает позже. При повторном ответе число КОКФ растет быстрее и более резко.

Эти изменения не свидетельствуют еще, конечно, о том, что стромальные клетки лимфоузлов распознают антигены и сохраняют иммунологическую память. Реакции стромальной ткани могут быть результатом воздействия на нее иммунологически компетентных клеток, распознающих антиген, которые, как известно, выделяют при этом целую гамму веществ, действующих на соседние клетки.

Приведенные сдвиги в численности КОКФ показывают, что в клеточной популяции, населяющей лимфоидные органы, число КОКФ может, очевидно, увеличиваться не только путем размножения самих КОКФ, но

и иным путем, а именно благодаря их дополнительному рекрутированию за счет приобретения колониеобразующих свойств теми клетками, которые в предшествующий момент ими не обладали, или (что менее вероятно) за счет репопуляции КОКФ.

Заслуживают также внимания сведения об изменении числа КОКФ в брюшной полости при образовании в ней воспалительного экссудата. Введение внутривенно тигликогенного бульона вызывает у молодых свинok, кроме резкого увеличения числа макрофагов, также и нарастание числа клоногенных предшественников фибробластов. Через три дня общее содержание КОКФ среди клеток перитонеального экссудата увеличивается в 10 раз, а их концентрация — в 20 раз. Таким образом, в ряде случаев, в том числе при иммунном ответе, удается показать, что перестройка лимфоидной ткани сопровождается изменениями численности содержащихся в ней стромальных клеток-предшественников.

*

Разобранные примеры показывают, что ответственными за микроокружение, действующее в лимфоидных органах и обеспечивающее протекание на их территориях дифференцировки иммунокомпетентных клеток, являются стромальные механоциты. Структура популяции стромальных механоцитов (т. е. клеток, ответственных за микроокружение) и лимфоидных клеток, обитающих в этом микроокружении, во многих отношениях различна. Во-первых, у них существенно разный жизненный цикл и темп обновления. В состоянии равновесия стромальные механоциты находятся практически вне митотического цикла. Они если и обновляются, то крайне медленно, хотя большинство из них (а возможно, даже они все) способны к пролиферации. Наоборот, большинство лимфоидных клеток активно пролиферирует, так что зрелые неделящиеся клетки быстро обновляются за счет специальных клеток-предшественников. Во-вторых, в противоположность лимфоидным и кроветворным клеткам стромальные механоциты — это местные, нерепопулирующие клетки, закрепленные за каждым кроветворным органом. Тем интереснее третье различие, касающееся стабильности дифференцировок. Для иммунокомпетентных клеток является правилом выраженная гетерогенность (одна клетка — одно по специфичности антитела, один класс иммуноглобулина, определенный по специфичности рецептор). Эти дифференцировочные особенности, отражающие активность генов, ответственных за иммунологическую компетентность, не только закреплены за клеткой, но, как правило, передаются вертикально, не изменяясь в пределах клона иммунокомпетентных клеток, происходящих от детерминированного предшественника.

У механоцитов стромы дело может обстоять иначе. Хотя прямые данные на этот счет пока отсутствуют, два обстоятельства указывают на такую возможность. Механоциты одного кроветворного органа, например, селезенки, могут давать начало образованию стромальных механоцитов другого, например костного мозга, (Фриденштейн, Лалыкина, 1973), создавая при этом вместо селезеночного костномозговое микроокружение. А если для оценки активности дифференцировочных генов, характерных для механоцитов, использовать тип синтезируемого ими коллагена, то окажется, что индивидуальный фибробласт может переходить с синтеза одного типа коллагена на синтез другого, что в

одном фибробласте одновременно могут синтезироваться коллагены двух разных типов (Gay e. a., 1976), что клонированные культуры механоцитов могут переходить с синтеза одного типа коллагена на синтез другого (Maupé e. a., 1976). Создается в связи с этим впечатление, что постоянная перестройка клеточного состава органов иммунитета, которая лежит в основе адаптации организма к меняющемуся антигенному фону, обеспечивается процессами селекции на уровне быстро пролиферирующих и репопулирующих из одного органа в другой иммунокомпетентных предшественников и более редко происходящими и медленно протекающими перестройками стромы, идущими без обязательной смены клеток, т. е. путем переключения их функций.

Интенсивные миграции кроветворных и лимфоидных клеток, репопуляция их предшественников хорошо согласуются с закрепленностью стромальных механоцитов в пределах органа — иначе различия между разными кроветворными органами утрачивались бы. Предстоит еще объяснить, в чем состоят преимущества органной специализации внутри кроветворной и лимфоидной системы или, другими словами, причины очевидной территориальной несовместимости определенных, часто завершающих этапов дифференцировки лимфоидных клеток-предшественников. Она проявляется в том, что для созревания один предшественник мигрирует в специальные органы (например, в тимус или фабрицеву сумку), куда доступ предшественников других типов (например, В-клеток в тимус и Т-клеток в фабрицеву сумку) «запрещен». Эта органная расчлененность является поздним приобретением в эволюции позвоночных: у низших, несмотря на появление тимуса нет еще четкого деления на кроветворные и лимфоидные органы. Можно ожидать, что органная специализация микроокружения как-то связана с совершенствованием иммунологических функций, в основе которых лежит регуляция поэтапной экспрессии генов, обеспечивающих иммунологическую активность.

Казалось бы, напрашивается предположение, что микроокружение, создаваемое стромальными механоцитами, существенно для прохождения только антигеннезависимых стадий развития клеток-предшественников, тогда как кооперации разных субпопуляций Т- и В-клеток между собой и с макрофагами обеспечивают прохождение антигензависимых этапов дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Но это, видимо, не так. Наряду с макрофагами стромальные механоциты играют, очевидно, существенную роль и в создании микроокружения для прохождения антигензависимых стадий дифференцировки. Вопрос о способности стромальных механоцитов распознавать антигены, о наличии у них соответствующих рецепторов собственного производства или присоединенных из окружающей среды остается открытым. Однако существуют веские указания на то, что стромальные механоциты оказывают выраженное влияние на антигензависимые стадии дифференцировки иммунокомпетентных клеток, в частности при антителообразовании.

Действительно, дифференцировка синтезирующих антитела плазматических клеток на стадии плазмобластов и на стадии зрелых плазматических клеток происходит внутри лимфоузлов на разных вторичных структурах (вторичных фолликулах и мягкотных шнурах) и требует миграции клеток на новое микроокружение. Удалось также прямо показать (Сидоренко и др., 1978), что костномозговые фибробласты оказывают резкое угнетающее, а тимические — резкое стимулирующее дей-

вие на образование антителопродуцирующих клеток в культурах селезеночных клеток в присутствии антигена. Эти эффекты еще более усиливаются в культурах селезеночных клеток, лишенных собственных А-клеток. Поэтому более правдоподобным представляется, что микроокружение, создаваемое стромальными механоцитами, существенно для прохождения как антигеннезависимой, так и антигензависимой стадий развития иммунокомпетентных клеток. Что же касается коопераций между самими иммунокомпетентными клетками и макрофагами, то она, очевидно, обеспечивает один из ключевых моментов в этом развитии — селекцию коммитированных предшественников, вступающих в пролиферацию и дифференцировку. Но и в этом процессе стромальное микроокружение, очевидно, играет свою роль.

Органная специфичность стромальных механоцитов в смысле их функций микроокружения не вызывает в настоящее время сомнений. Более интересный и сложный вопрос заключается в том, насколько стромальные механоциты гетерогенны в пределах одного лимфоидного органа. В простейшей форме этот вопрос может быть поставлен так: существует ли столько же разных типов стромальных механоцитов, сколько имеется типов микроокружения в лимфоидных органах — специальных механоцитов, свойственных мозговому и корковому слою лимфоузлов и тимуса, тимусзависимым и тимуснезависимым зонам вторичных лимфоидных органов и т. д.? Ответа на этот вопрос пока нет, так же как и сведений о том, каковы механизмы с помощью которых стромальные механоциты осуществляют свое воздействие на лимфоидные клетки.

Литература

- Бернет Ф. М. Клеточная иммунология. М., «Мир», 1971.
- Дидух М. С., Фриденштейн А. Я. К вопросу о гистогенетических отношениях между лимфоцитами и ретикулярными клетками при трансплантации лимфатических узлов. — Цитология, 1970, 12, с. 901—912.
- Лурия Е. А. Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. М., «Медицина», 1972.
- Сидоренко А. М., Кулагина Н. Н., Фриденштейн А. Я. Влияние стромальных механоцитов кроветворных органов на образование в культурах антителопродуцирующих клеток. — Цитология, 1978, 20, с. 875—881.
- Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клеточные предшественники. М., «Медицина», 1973.
- Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина К. С. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворной ткани морских свинок. — Цитология, 1970, 12, с. 1147—1155.
- Фриденштейн А. Я., Чайлахян Р. К., Лалыкина Н. В. и др. Стромальные клетки, ответственные за перенос микроокружения в кроветворной и лимфоидной ткани. — Пробл. гематол., 1973, 18, с. 14—19.
- Фриденштейн А. Я., Чертков И. Л. Клеточные основы иммунитета. М., «Медицина», 1969.
- Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы кроветворения. М., «Медицина», 1977.
- Abramson S., Miller R. G., Phillips R. A. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. — J. Exptl Med., 1977, 145, p. 1567—1579.
- Basch R. S., Kadish J. L. Hematopoietic thymocyte precursors. II. Properties of the precursors. — J. Exptl Med., 1977, 145, p. 405—419.
- Bevan M. J., Epstein R., Cohn M. Effect of 2-mercaptoethanol on murine mixed lymphocyte cultures. — J. Exptl Med., 1974, 139, p. 1025—1037.
- Calderon J., Kiely J. M., Lefko J. L., Unanue E. P. The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages. — J. Exptl Med., 1975, 142, p. 151—164.
- Erb P., Feldman M. The role of macrophages in the generation of T-helper cells. — J. Exptl Med., 1975, 142, p. 460—472.
- Feldman M., Nossal G. J. V. Tolerance, en-

- hancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophages.—*Transplant. Rev.*, 1972, 13, p. 3—47.
- Friedenstein A. Ja. [Фриденштейн А. Я.]. Determined and inducible osteogenic precursor cells.—*Giba Found. Sympos. II. Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization*. Amsterdam, 1973, p. 169.
- Friedenstein A. Ja. [Фриденштейн А. Я.]. Precursor cells for mechanocytes.—*Intern. Rev. Cytol.*, 1976, 47, p. 327—331.
- Gay S., Martin G. R., Müller P. K. e. a. Simultaneous synthesis of types I and III collagen by fibroblasts in culture.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 4037—4040.
- Hall J. G. Observations on the migration and localization of lymphoid cells.—*Progr. Immunol.*, 1974, 11, p. 15—38.
- Hanna M. G. J., Szaval A. K. Localization of ²⁵¹I labelled antigen in germinal centers of mouse spleen.—*J. Immunol.*, 1968, 101, p. 949—956.
- Hay J. B., Hobbs B. B. The flow of food to lymphnodes and its relation to lymphocyte traffic and the immune response.—*J. Exptl Med.*, 1977, 145, p. 31—44.
- Katz D. H., Benacerraf B. The function and interrelationships of T cell receptor, Ir genes, and other histocompatibility gene product.—*Transplant. Rev.*, 1975, 22, p. 175—230.
- Lipsky P. E., Rosenthal A. S. Macrophage-lymphocyte interaction.—*J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 138—154.
- Mayne R., Vail M. S., Mayne P. M., Miller E. Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity.—*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1976, 73, p. 1674—1678.
- McClain D. A., Edelman G. M. Analysis of the stimulation-inhibition paradox exhibited by lymphocytes exposed to concavalin A.—*J. Exptl Med.*, 1976, 144, p. 1494—1508.
- Metcalf D., Moore M. A. S. Haemopoietic cells. Amsterdam, 1971.
- Metcalf D., Nossal G. J. V., Warner N. L. e. a. Growth of B-lymphocyte colonies in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1975, 142, p. 1534—1549.
- Miller J. F. A. P. Cellular basis of the immune response.—7th Karolinska Sympos. Stockholm, 1974, p. 55.
- Miller J. F. A. P., Vadas M. A., Whilelaw A., Gamble J. Role of major histocompatibility complex gene product in delayed-type hypersensitivity.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 2486—2490.
- Möller G., Lemke H., Opitz H.-G. The role of adherent cells in the immune response. Fibroblasts and product released by fibroblasts and peritoneal cells can substitute for adherent cells.—*Scand. J. Immunol.*, 1976, 5, p. 269—280.
- Mosier D. E. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro.—*Science*, 1967, 158, p. 1575—1579.
- Mosier D. E., Coppelson L. W. A three-cell interaction required from the induction of the primary immune response in vitro.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1968, 61, p. 542—547.
- Nossal G. J. V. Cellular genetics of immune response.—*Adv. Immunol.*, 1962, 2, p. 163—205.
- Nossal G. J. V., Kinetics of antibody formation and regulatory aspects of immunity. 7th Karolinska Sympos. Stockholm, 1974, p. 96—116.
- Nossal G. J. V., Abbot A., Mitchell J., Lummus Z. Antigens in immunity.—*J. Exptl Med.*, 1968, 127, p. 277—288.
- Rosenthal A. S., Shevach E. M. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes.—*J. Exptl Med.*, 1973, 138, p. 1194—1212.
- Scheid M. P., Hoffman M. K., Komuro K., Hämmerling U. e. a. Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and nonthymic agents.—*J. Exptl Med.*, 1973, 138, p. 1027—1032.
- Schilling R. M., Phillips R. A., Miller R. G. Requirement for non-T cells in the generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1976, 144, p. 241—258.
- Stamper H. B., Woodruff J. J. Lymphocytes noming into lymph nodes.—*J. Exptl Med.*, 1976, 144, p. 828—833.
- Steinman R. M., Lustig D. S., Cohn Z. A. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 1431—1440.
- Thomas D. W., Shevach E. M. Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes. II. T-cell activation by direct modification of macrophage histocompatibility antigens.—*J. Exptl Med.*, 1977, 145, p. 907—915.
- Unanue E. R. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation.—*Adv. Immunol.*, 1972, 15, p. 96—166.
- Wekerle H., Cohen I. R., Feldman M. Thymus reticulum cells cultures conter T cell properties on spleen cells from thymus-deprived animals.—*Europ. J. Immunol.*, 1973, 3, p. 745—752.

КООПЕРАЦИЯ КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

Современный этап развития иммунологии характеризуется крупными достижениями в изучении клеточных основ иммунных реакций. Чрезвычайно важным явилось открытие тимусзависимой и тимуснезависимой систем иммунитета, с помощью которых реализуется иммунный ответ организма на антигенный стимул. В 1969 г. Ройтом (Roitt *et al.*, 1969) были введены символы «Т» и «В» для обозначения двух классов лимфоцитов, представляющих собой тимус- и бурсазависимую системы лимфоидных клеток. Т-система иммунитета, зависящая от тимуса, обеспечивает развитие реакций клеточного типа с накоплением сенсibilизированных лимфоцитов. Система В-клеток, зависящая от сумки Фабрициуса у птиц и неизвестного ее аналога у млекопитающих, ответственна за реализацию гуморального иммунного ответа, сопровождающегося выработкой антител. Однако, осуществляя свои эффекторные функции, Т- и В-лимфоциты работают не одни. В разрушении чужеродного трансплантата, например, помимо Т-клеток-киллеров, принимают участие макрофаги и нейтрофилы, в реакцию вовлекаются несенсибилизированные лимфоциты, активируется выработка антител. Для индукции синтеза антител В-клетками необходимы сигналы со стороны Т-клеток и макрофагов, включающие иммунопозитивскую дифференцировку клеток-предшественников. Помимо Т-клеток-помощников, запускающих антителообразование к большинству антигенов, обнаружены Т-клетки-супрессоры, подавляющие выработку антител (Gershon, 1974; Taylor, Basten, 1976).

В последние годы появились работы, свидетельствующие о наличии кооперативных процессов не только при индукции иммунного ответа. Показано взаимодействие клеток и в продуктивную фазу, что обеспечивает, по-видимому, регуляцию антителообразования в этот период (Petrov, Mikhailova, 1972). Это выражается в стимулирующем действии клеток костного мозга на антителогенез на пике иммунного ответа (Mikhailova *et al.*, 1971; Михайлова и др., 1972). Все эти факты кооперации различных типов клеток в процессе антителогенеза являются, вероятно, отдельными звеньями сложной цепи клеточных взаимодействий, сопровождающих индукцию и последующие этапы развития гуморального иммунного ответа. В настоящем обзоре рассмотрены существующие представления о кооперации клеток при индукции иммунного ответа и в его продуктивную фазу, а также сформулированы общие положения о роли взаимодействия клеток в гуморальном иммунитете.

VII.1. ИНИЦИИРУЮЩИЕ КООПЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Необходимость кооперации различных типов клеток для индукции антителогенеза была обнаружена еще до введения терминов «Т-лимфоциты» и «В-лимфоциты». Из многочисленных экспериментов стало очевидным, что переработанный макрофагом антиген или информация о нем передается другим типам клеток, в результате чего появляются клетки, синтезирующие антитела к данному антигену (Upanue, Calderon, 1975).

В 1966—1968 гг. было наглядно продемонстрировано взаимодействие клеток тимусного и костномозгового происхождения при индукции ответа к эритроцитам барана (Claman e. a., 1966; Davies e. a., 1967; Miller, Mitchell, 1968). Введение летально облученным реципиентам вместе с эритроцитами барана клеток тимуса или костного мозга не приводило к существенному накоплению антителообразующих клеток в селезенке реципиентов. Если же вместе с эритроцитами барана вводили смесь тимических и костномозговых клеток, то регистрировалось в 20 раз большее количество антителопродуцентов, чем ожидалось от простого суммирования потенций клеток тимуса и костного мозга. Таким образом, при введении вместе с антигеном смеси клеток костного мозга и тимуса (или лимфы грудного протока), которые сами по себе в отдельности неактивны в отношении выработки антител, происходит синергическое накопление антителообразующих клеток. Анализ с применением хромосомной метки Т6Т6 показал, что антителообразующие клетки происходят из костномозговых предшественников (Nossal e. a., 1968). Это исследование обосновало два фундаментальных положения. Во-первых, при индукции гуморального иммунного ответа необходима кооперация Т- и В-лимфоцитов. Во-вторых, развитие антителообразующих клеток происходит из костномозговых предшественников, т. е. из В-лимфоцитов. Т-лимфоциты выступают в роли помощников. Взаимодействие Т- и В-клеток при индукции иммунного ответа к большинству антигенов было в дальнейшем подтверждено на различных экспериментальных моделях (Фонталли и др., 1967; Chan e. a., 1970; Munro, Hunter, 1970; Петров и др., 1972).

Наряду с антигенами, для индукции ответа к которым требуется присутствие Т-клеток, существуют антигены, вызывающие иммунный ответ без участия Т-клеток. Они получили название тимуснезависимых антигенов. К ним относятся некоторые микробные липополисахариды и полисахариды, например Vi-антиген сальмонелл, пневмококковый полисахарид, липополисахарид *Escherichia coli*. Повторяющиеся тождественные друг другу антигенные детерминанты, насаженные на жесткую полисахаридную цепь, а также слабый метаболизм полимерной молекулы в организме, — две характерные особенности, присущие всем тимуснезависимым антигенам (Sela, Mozes, 1975). Однако, как будет показано ниже, наличие таких антигенов не противоречит положению о необходимости кооперации Т- и В-лимфоцитов при индукции иммунного ответа.

VII.1.1. Роль Т-клеток-помощников в индукции антителогенеза

Установлено, что В-клетки имеют на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы, с помощью которых взаимодействуют с гаптенной частью молекулы антигена. Т-лимфоциты имеют рецепторы по от-

ношению к несущей части антигенной молекулы и осуществляют свою функцию помощников при участии растворимых медиаторов. Гуморальная природа влияния Т-клеток была доказана в опытах по индукции антителообразования к эритроцитам барана в культуре мышинных клеток селезенки, лишенных Т-лимфоцитов (Schimpl, Wecker, 1972). Иммунный ответ в такой суспензии развивался при добавлении в культуру тимоцитов или инкубационной среды, полученной после культивирования Т-лимфоцитов с аллогенными клетками. Отсюда следует, что при индукции ответа к эритроцитам барана функцию Т-клеток мог выполнять гуморальный фактор, вырабатываемый Т-лимфоцитами, активированными антигенами гистосовместности. Впоследствии было показано, что подобный фактор (или факторы) можно получить и при активации Т-клеток другими антигенами (Rubin, Coops, 1972; Waldmann, Munro, 1974), а также неспецифическими митогенами (Schimpl, 1975; Waldmann e. a., 1976). Таким образом, стимулированные клетки вырабатывают гуморальный фактор (или факторы), который оказывает неспецифическое воздействие на В-клетки, индуцируя в них ответ на имеющийся антигенный стимул.

Химическая природа неспецифического фактора Т-клеток активно изучается. Известно, что он выдерживает 30-минутное нагревание при 56° С, но разрушается при нагревании до 60° С в течение одного часа. Он устойчив к ДНКазе и РНКазе, но инактивируется протеазами. Молекулярный вес фактора равен 30 000—60 000 (Rubin, Coops, 1972; Rubin e. a., 1973; Armerding, Katz, 1974; Waldmann, Munro, 1974). Есть сведения о том, что фактор, замещающий Т-клетки, является секреторной формой рецепторной молекулы Т-лимфоцита, индуцируемой генами главного комплекса гистосовместности (Armerding, Katz, 1974; Armerding e. a., 1974).

Помимо неспецифического фактора, Т-клетки вырабатывают еще и специфический медиатор, опосредующий индукцию антителообразования в В-лимфоцитах (Feldmann, Basten, 1972; Taussig, 1974a). Используя в качестве антигена гаптен-носитель и разделяя Т- и В-клетки миллипоровой мембраной, Фелдман и Бастен (Feldmann, Basten, 1972) показали, что Т-лимфоциты, активированные носителем, выделяют фактор, стимулирующий В-клетки к синтезу антител против гаптена. Выработка фактора наблюдалась только в том случае, если гаптен был присоединен к тому же носителю, которым активированы Т-клетки. Если Т-клетки активировались другим антигеном, например эритроцитами осла, фактор не выделялся.

По данным Фелдмана и соавторов (Feldmann, Basten, 1972; Feldmann e. a., 1973), специфический фактор Т-клеток неанализуем и является макроглобулином типа IgM (м. в. порядка 150 000). Этот иммуноглобулин получил название IgT. Другие исследователи, изучавшие специфический медиатор, вырабатываемый Т-лимфоцитами, не подтвердили его иммуноглобулиновую природу. Так, факторная активность не исчезала после адсорбции на колонках с иммуносорбентами против легких цепей иммуноглобулинов, но значительно уменьшалась после контакта с анти-Н2-антителами (Taussig, Munro, 1974).

Следует подчеркнуть, что Т- и В-лимфоциты эффективно взаимодействуют при условии сингенности кооперирующих клеток. Встреча аллогенных лимфоцитов вызывает, по-видимому, инактивацию клеток-предшественников. Было показано, что при совместном введении клеток селе-

зеньки СВА и С57BL с эритроцитами барана облученными реципиентами (СВА \times С57BL) F_1 в селезенках реципиентов накапливалось в 4 раза меньше антителообразующих клеток, чем это ожидалось от простого суммирования потенций введенных селезеночных суспензий (Petrov e. a., 1968).

В опытах по изучению взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, полученных от конгенных штаммов мышей, установлено, что процессы клеточной кооперации находятся под контролем генов, сцепленных с главным комплексом генов гистосовместимости. Было показано, что за молекулярное распознавание между взаимодействующими Т- и В-лимфоцитами ответственны поверхностные структуры, кодируемые генами I-области H-2-комплекса, которые принимают участие также в генетическом контроле иммунного ответа (Katz, 1975; см. раздел VIII).

На основании всех изложенных данных можно заключить, что при индукции иммунного ответа к тимусзависимым антигенам включение В-клеток в антителогенез происходит при участии Т-клеток-помощников, действие которых опосредовано специфическими и неспецифическими медиаторами.

VII.1.2. Роль макрофагов в индукции антителогенеза

В процессах индукции гуморального иммунного ответа, помимо В- и Т-лимфоцитов, принимает участие третий тип клеток — макрофаги. В экспериментах *in vitro* было показано, что удаление из селезеночной популяции тех клеток, которые прилипают к стеклу или пластику, приводит к снижению иммунного ответа к эритроцитам барана (Mosier, 1967; Roseman, 1969; Hoffmann, 1970). Эти клетки получили название А-клеток (от слова adhere — прилипать). Они характеризуются радиорезистентностью (Mosier, 1967; Roseman, 1969), большинство из них представляет собой макрофаги.

Одной из основных функций макрофагов, существенной для индукции иммунного ответа, является, по-видимому, переработка антигена в наиболее иммуногенную форму (Waldron e. a., 1974; Unanue, Calderon, 1975). Имеется много данных о значительном повышении иммуногенности антигенного материала, захваченного макрофагами, по сравнению с инативным антигеном (Askonas, Jaroskova, 1970; Анфалова, Галактионов, 1975; Nakano, Muramatsu, 1976). Однако вопрос о природе иммуногенного материала до сих пор остается открытым. Предположение о том, что макрофаги, перерабатывающие антиген, производят информационную РНК, которая передается в другие клетки в качестве готовой матрицы для синтеза антител (Fishman, 1961), не получило серьезного экспериментального подтверждения. Допускается, что макрофаги обеспечивают образование комплекса антигена с молекулами РНК (Askonas, Rhodes, 1965; Friedman e. a., 1965) или расщепляют антиген на фрагменты, легко стимулирующие клетки (Feldmann, Palmer, 1971).

Работы последних лет показывают, что роль макрофагов не ограничивается переработкой антигена и доведением его до активной молекулярной формы. Макрофаги имеют специальные рецепторы к Fc-фрагментам тяжелых цепей иммуноглобулинов и к С3-компоненту комплемента (Unanue, Calderon, 1975; Walker, 1976). Существует мнение, что захваченный макрофагом антиген приобретает определенную пространствен-

ную ориентацию на поверхности клетки и таким образом становится более иммуногенным для В-лимфоцитов, фиксация антигена на поверхности макрофага происходит при участии Т-клеточного медиатора (Feldman, 1972).

Эффективность взаимодействия макрофагов с лимфоцитами зависит не только от наличия иммуногена на плазматической мембране макрофага. Она связана с распознаванием генетически детерминированных поверхностных структур и, так же как в случае взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, требует генетической тождественности кооперирующих клеток. Опыты по макрофагальной индукции иммунного ответа к эритроцитам барана у мышей разных генотипов хорошо иллюстрируют это положение (Галактионов, Аифалова, 1974; Галактионов и др., 1974). Переработавшие антиген макрофаги («иммунные» макрофаги) вводили сингенным или аллогенным реципиентам. На 5-й день после их введения определяли число антителообразующих клеток в селезенке реципиента. Величина иммунного ответа при аллогенном переносе резко подавлялась по сравнению с сингенным переносом. Однако если аллогенные пары донор — реципиент были идентичны по H-2-системе, то величина ответа практически не отличалась от сингенной комбинации. Подавление ответа при переносе аллогенных макрофагов не было следствием отторжения донорских клеток, так как снижение ответа наблюдалось и при переносе макрофагов родительской линии в F₁-гибридов (Галактионов, Аифалова, 1974). Дальнейшие опыты показали, что предварительная инкубация иммунных макрофагов с РНК селезенки интактных аллогенных реципиентов снимает эффект подавления макрофагальной индукции (Галактионов и др., 1974). Авторы предполагают, что аллогенная РНК реципиентов обеспечивает образование на поверхности макрофагов рецепторных структур, соответствующих генотипу той линии мышей, от которых получена РНК. Макрофаги становятся как бы «своими» для лимфоцитов реципиента, что обеспечивает нормальный процесс клеточного взаимодействия.

VII.1.3. Модели взаимодействия Т- и В-лимфоцитов и макрофагов при индукции иммунного ответа

На основании всех изложенных данных были предложены различные гипотезы о трехклеточных системах иммунопоза. В 1969 г. несколько авторов независимо друг от друга предположили, что процесс антителогенеза инициируется в результате кооперации трех типов клеток: клеток-предшественников (В-лимфоцитов), Т-лимфоцитов и макрофагов (Bergbaum, 1969; Петров, 1969; Roitt, 1969). При возникновении антигенного стимула В-лимфоцит-предшественник под влиянием сигналов со стороны Т-клеток-помощников и макрофагов переходит из покоящегося состояния в метаболически активную фазу, обеспечивающую клональную пролиферацию и дифференцировку в плазматическую клетку, активно синтезирующую и секретирующую антитела. Роль макрофагов существенна, по-видимому, на самом первом этапе распознавания антигена и приведения его в иммуногенную форму. Опыты с использованием антимакрофагальных сывороток показали необходимость присутствия макрофагов лишь в первые сутки после введения антигена, т. е. в момент антигенной стимуляции (Галактионов, Аифалова, 1974).

Все теории индукции антителогенеза в В-лимфоцитах можно разделить на две группы: теория односигнальной и двухсигнальной активации В-лимфоцитов. Сторонники односигнальных теорий постулируют необходимость одного сигнала для перехода покоящегося В-лимфоцита в метаболически активную фазу. Одни авторы (Coutinho, Möller, 1974; Möller, 1975) считают, что этим сигналом является неспецифическое митогенное влияние антигена, а не взаимодействие антигенных детерминантов с рецепторами на поверхности В-клетки. Иммуноглобулиновые рецепторы, по их мнению, обеспечивают лишь концентрирование антигена на определенных В-клетках, что приводит к преимущественной активации клонов, детерминированных к синтезу антител данной специфичности. Экспериментальное обоснование этой гипотезы опирается на результаты опытов по изучению влияния тимуснезависимых антигенов на В-клетки. Большинство известных тимуснезависимых антигенов обладают свойствами поликлональных активаторов и являются митогенами для В-клеток (Doenhoff e. a., 1976). Имеются данные о том, что некоторые В-клеточные митогены вызывают поликлональный синтез антител в отсутствие специфического антигена (Andersson e. a., 1972). Отсюда делается вывод, что сигналом, вызывающим индукцию иммунной реактивности в В-клетке, является неспецифическое митогенное воздействие, а не связывание специфических антигенных детерминант иммуноглобулиновыми рецепторами.

Однако есть факты, которые не укладываются в представление о ведущей роли поликлонального воздействия в активации В-клетки. Так, существуют Т-независимые антигены, которые не вызывают митогенного эффекта или поликлонального синтеза антител (Mosier e. a., 1974). Кроме того, есть сведения об отсутствии корреляции между степенью митогенности тимуснезависимого носителя и силой иммунного ответа к присоединенному к нему гаптену. Известно, например, что пневмококковый полисахарид является лучшим митогеном, чем леваи, однако ответ к динитрофенильной группе, конъюгированной с леваном, был выше, чем при конъюгировании данного гаптена с пневмококковым полисахаридом (Klaus, Hamphrey, 1974).

Вторая точка зрения о природе стимулирующего сигнала заключается в том, что активация В-клеток происходит в результате взаимодействия антигенных детерминант с иммуноглобулиновыми рецепторами В-лимфоцита (Feldmann e. a., 1975 b; Klaus, Hamphrey, 1975). В случае тимуснезависимых антигенов многоточечное присоединение густо повторяющихся детерминант к поверхности В-клетки обеспечивает высокую энергию связывания антигена с В-лимфоцитом, что приводит к его активации. В случае тимусзависимых антигенов необходимая для активации структура антигенных детерминант создается с помощью Т-лимфоцитов, которые концентрируют антиген и представляют его В-клетке в поливалентной форме. Так, согласно гипотезе Фелдмана и соавторов (Feldmann, Basten, 1972; Feldmann, Nossal, 1972), Т-клетки полимеризуют антиген на поверхности макрофага. Молекулы антигена связываются носителем с IgT, вырабатываемым активированными Т-лимфоцитами. Комплексы антиген—IgT присоединяются к макрофагу, в результате чего на поверхности макрофага создается обойма из антигенных молекул, ориентированных гаптеными группировками наружу. Такая структура с высокой плотностью идентичных антигенных детерминант и активирует В-клетку (рис. 37). При отсутствии макрофагов, являющихся местом

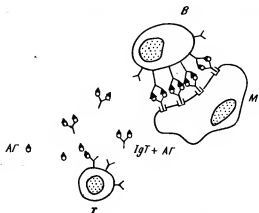


Рис. 37. «Полимеризация» антигена на поверхности макрофага с помощью IgT, вырабатываемого активированными Т-лимфоцитами (Feldmann, 1973)

АГ — антиген;
В — В-лимфоцит;
М — макрофаг;
Т — Т-лимфоцит

структурной организации антигена, развивается не иммунный ответ, а толерантность (Feldmann, 1973). Таким образом, односигнальная модель также предусматривает кооперацию различных типов клеток при создании активирующего стимула. Существование тимуснезависимых антигенов, очевидно, не противоречит положению о необходимости взаимодействия клеток при индукции антителообразования. В данном случае сама антигенная молекула фактически представляет собой мультигаптенную «обойму», которую Т-клетки и макрофаги обеспечивают для тимуснезависимых антигенов.

Главный вопрос, вызывающий разногласия среди сторонников односигнальной модели активации В-клетки, касается природы сигнала, индуцирующего переход покоящегося В-лимфоцита в метаболически активное состояние. Получает ли В-клетка этот сигнал от иммуноглобулиновых рецепторов, присоединивших антиген, или судьбу В-клетки определяет митогенный стимул, исходящий от антигенной молекулы?

По-видимому, индукция антителообразования в В-клетке — это сложный процесс, связанный с последовательным воздействием на клетку как специфических, так и неспецифических стимулов, обеспечивающих ее пролиферацию, дифференцировку и индукцию синтеза антител. Именно такой точки зрения придерживаются сторонники двусигнальной теории. Двусигнальная теория предполагает наличие двух последовательных сигналов, необходимых для индукции в В-лимфоците процессов пролиферации и дифференцировки в антителообразующие клетки. Согласно данной гипотезе, первый сигнал обеспечивается взаимодействием гаптенных детерминант с рецепторами на поверхности В-клетки, а второй исходит от кооперирующих Т-клеток-помощников, распознающих детерминанты носителя. В кооперации могут принять участие не только Т-клетки, стимулированные антигеном. Эффективны сигналы и от Т-клеток, активированных посторонними антигенами, например аллоантигенами (Schimpl, Wecker, 1972, 1975). В ряде случаев помощь со стороны Т-клеток может быть заменена индуктивным влиянием на В-клетку полимерных молекул (Schradet, 1974a; Петров и др., 1974, 1975). Это показано в опытах на мышах, лишенных Т-лимфоцитов (тимэктомизированных, облученных и восстановленных клетками костного мозга). Введение таким В-мышам синтетических полимеров со свойствами полианионов (полн-4-винилпирдин, полиакриловая кислота) вместе с эритроцитами барана приводит

к выражению развитию иммунного ответа, в то время как контрольные В-мыши, которым не вводились данные препараты, практически не отвечали на антиген (Петров и др., 1975). Полианионы способны также усиливать кооперацию между Т- и В-клетками при их совместном введении с антигеном облученным реципиентам (Петров и др., 1974, 1975), причем использование полиамфолитов, содержащих в одной молекуле как кислотные, так и основные группы, вызывало подавление клеточной кооперации (Евдаков и др., 1975).

Гипотеза двух сигналов подтверждается следующими экспериментальными данными. При индукции антителообразования к гаптену, конъюгированному с неиммуногенным носителем, ответа в культуре клеток селезенки не наблюдается. Выработку антител к гаптену можно было получить при добавлении в культуру Т-лимфоцитов, активированных аллоантигенами, т. е. при наличии сигнала от Т-клеток. О необходимости второго сигнала свидетельствуют также опыты, в которых ответ к гаптенам (ди- и тринитрофенолы), а также тимусзависимым антигенам (эритроциты барана) получали и при отсутствии Т-клеток, когда в культуру добавляли полимерные молекулы, такие, как бактериальный липополисахарид, полимеризованный флагеллин сальмонелл или полианионы (Schradar, 1974).

Однако второй сигнал поступает к В-клетке после взаимодействия ее иммуноглобулиновых рецепторов с антигенными детерминантами. Об этом свидетельствует прежде всего строгая специфичность иммунного ответа. В случае когда первый сигнал отсутствует (стимуляция В-клеток митогенами), наблюдается поликлональный синтез иммуноглобулинов. Второй сигнал воздействует на В-клетку, когда иммуноглобулиновые рецепторы на ее поверхности уже заблокированы гаптенными детерминантами. Отсюда следует, что точкой приложения второго сигнала являются структуры иные, чем иммуноглобулиновые рецепторы.

Предполагается далее, что первый сигнал в отсутствие второго вызывает состояние толерантности в В-клетке. Второй сигнал как бы снимает толерогенное действие первого сигнала и обеспечивает превращение В-лимфоцита-предшественника в зрелую антителообразующую клетку (Bretcher, Cohn, 1968; Bretcher, 1975). Показано, например, что тимусзависимые антигены (эритроциты барана и гамма-глобулин птиц) вызывают паралич В-клетки при их введении бестимусным мышам (nude) (Mitchell e. a., 1974). При стимуляции В-клеток гаптеном, конъюгированным с неиммуногенным носителем, иммунный ответ также не развивается (Katz e. a., 1974). Если же в такую систему добавить бактериальный липополисахарид или использовать тот же гаптен, конъюгированный с иммуногенным носителем, состояние толерантности снимается и в клетке индуцируется антителопродукция (Katz e. a., 1974).

Дальнейшее развитие гипотезы двух сигналов представлено в работах Ватсона с соавторами (Watson e. a., 1973; Watson, 1975). Эти исследователи предположили наличие внутриклеточных медиаторов, обеспечивающих передачу сигналов с мембраны В-лимфоцита внутрь клетки. В результате первого сигнала в клетке повышается содержание цАМФ. Второй сигнал вызывает повышение уровня цГМФ. Увеличение отношения цАМФ/цГМФ инициирует биохимические процессы, обеспечивающие клеточную толерантность. Снижение соотношения этих метаболитов приводит к индукции синтеза ДНК, пролиферации и созреванию антителообразующих клеток. Однако данная гипотеза не имеет прямых экспери-

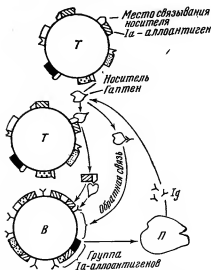


Рис. 38. Модель активации В-клетки, объясняющая роль генетически детерминированных поверхностных структур (Ia-антигенов) при кооперации Т- и В-лимфоцитов (Sacks, Dickler, 1975)

В — В-лимфоцит;

Т — Т-лимфоцит;

П — плазматическая клетка

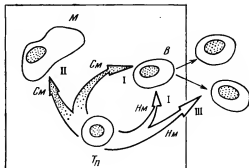


Рис. 39. Возможные варианты действия специфических (См) и неспецифических (Нм) медиаторов Т-клеток-помощников (Тн) при индукции иммунного ответа

I — прямое действие на В-клетку;

II — через макрофаги (М);

III — включение пролиферации и (или) дифференцировки клеток-предшественников

ментальных доказательств, и вопрос о роли циклических монофосфатов в индукции иммунного ответа активно изучается (см. раздел V).

В настоящее время нет ясности по поводу конкретных межклеточных связей, обеспечивающих сигналы, активирующие В-клетку. Предложены разнообразные схемы последовательности кооперативных процессов, которые приводят к возникновению этих сигналов (Bretcher, Cohn, 1968; Петров, 1969, 1970; Barton, Diener, 1975).

Одна из таких схем объясняет роль генетически детерминированных поверхностных структур (Ia-антигенов) при взаимодействии Т- и В-лимфоцитов (Sacks, Dickler, 1975). Согласно этой модели (рис. 38) Ia-антигены на Т-клетках тесно связаны с местом специфического присоединения носителя, а Ia-антигены на В-клетках связаны с Fc-рецепторами. Т-клетка взаимодействует с носителем стимулирующего антигена, в результате чего от нее открепляется комплекс антиген — рецептор, в состав которого входит Ia-молекула. Свободная группировка стимулирующего антигена, входящего в этот комплекс, обеспечивает его концентрирование на В-клетках, несущих иммуноглобулиновые рецепторы данной специфичности. Однако активация В-клетки произойдет лишь в том случае, если Ia-молекула, открепившаяся от Т-лимфоцита, найдет соответствующую Ia-молекулу на поверхности В-лимфоцита. Модель объяс-

яет и дальнейшую регуляцию антителообразования. Активированная В-клетка дает клоны антителопродуцентов. Синтезированные ими антитела связываются затем с антигеном, образуя комплексы, которые могут присоединяться к Fc-рецепторам на поверхности В-клеток. Поскольку допускалось, что Fc-рецептор тесно связан с поверхностным антигеном В-клеток, такое присоединение препятствует дальнейшему их взаимодействию с Ia-антигенами Т-клеток. Активация В-клеток, таким образом, прекращается.

Какие же ответные реакции вызывают в В-клетке воздействующие на нее активирующие сигналы? Некоторые исследователи считают, что первый сигнал не приводит к видимым изменениям в В-лимфоците. Взаимодействие антигенных детерминант с иммуноглобулиновыми рецепторами на поверхности В-клетки является лишь стадией селекции и обеспечивает чувствительность данного В-лимфоцита к последующим стимулам. Только второй сигнал, исходящий от Т-клеток-помощников или митогенов, индуцирует пролиферацию, дифференцировку и последующую антителопродукцию (Watson *et al.*, 1973).

Однако имеются работы (Hunig *et al.*, 1974; Dutton, 1975), в которых показано, что пролиферация и дифференцировка В-клетки — это два отдельных этапа ее активации, вызванные разными сигналами. Взаимодействие антигенных детерминант с иммуноглобулиновыми рецепторами приводит к бласттрансформации В-лимфоцита, синтезу ДНК и пролиферации. Второй сигнал, генерируемый Т-клетками, обеспечивает дифференцировку уже размножающихся В-лимфоцитов в зрелые антителопродуценты. Доказательства такой последовательности процессов пролиферации и дифференцировки были получены в опытах с использованием культуры клеток селезенки бестимусных мышей. Ответ к тимус-зависимому антигену (эритроцитам осла) получали при добавлении в культуру Т-клеток. Сила ответа не зависела от того, вводились ли Т-клетки в культуру одновременно с антигеном или через 40 час после антигенной стимуляции, что свидетельствует о развитии пролиферативных процессов в В-клетках без участия Т-лимфоцитов (Dutton, 1975). Индукция пролиферации в В-клетках до поступления второго сигнала показана также в опытах с временным блокированием размножения В-лимфоцитов горячим ³H-тимидином. Добавление Т-клеток в культуру после удаления ³H-тимидина не приводило к повышенной ответу (Dutton, 1975).

Эти данные свидетельствуют о том, что помощь со стороны Т-клеток требуется уже размножающимся В-лимфоцитам. Не исключено, однако, что специфический медиатор, выделяемый Т-клетками, необходим в момент антигенного воздействия, поскольку есть сведения о его участии в преобразовании антигена в иммуногенную форму (Feldmann, Basten, 1972). Возможные варианты действия специфических и неспецифических Т-клеточных медиаторов изображены на рис. 39.

Рассмотренные кооперативные процессы между макрофагами, Т-лимфоцитами и В-лимфоцитами обеспечивают включение (triggering) иммунного ответа при антигенной стимуляции. Они протекают на уровне предшественников антителообразующих клеток и инициируют вступление В-лимфоцитов в пролиферацию и дифференцировку. Т-лимфоциты и макрофаги выступают в данном случае в роли вспомогательных клеток, необходимых для активации В-лимфоцитов. Помимо инициирующих антителогенез взаимодействий, существуют супрессирующие кооперативные процессы, которые рассмотрены в следующем разделе работы.

VII.2. СУПРЕССИРУЮЩИЕ КООПЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

В последние годы стало известно, что Т-лимфоциты, помимо функции клеток-помощников при индукции иммунной реакции, могут выполнять роль клеток-супрессоров. Ингибирующее влияние на иммунный ответ обнаружено также и со стороны В-лимфоцитов и макрофагов. Эти супрессирующие клеточные взаимодействия играют, очевидно, ведущую роль в регуляции иммунного ответа и в настоящее время активно изучаются.

VII.2.1. Т-клетки-супрессоры

Супрессивное действие Т-клеток было впервые выявлено в экспериментах с использованием толерантных животных. Известно, что лимфоциты толерантных доноров способны отвечать на специфический антиген при определенных условиях. Так, предварительная инкубация толерантных клеток в культуре *in vitro* в течение суток восстанавливает их способность к иммунному ответу при переносе в облученный организм (McGregor e. a., 1967; Sjöberg, 1972). Состояние толерантности снимается также введением аллогенных клеток (McCullagh, 1970) или воздействием ионизирующей радиации (Zan-Bar e. a., 1974). В то же время лимфоциты, полученные от толерантных животных, подавляют иммунный ответ, если их перенести облученному реципиенту вместе с интактными клетками селезенки и антигеном (Gershon, Kondo, 1971a; Gershon, 1974; Phanuphak e. a., 1974; Zan-Bar e. a., 1974). Элиминация Т-лимфоцитов из суспензии толерантных клеток отменяет их супрессивное действие (Gershon, 1974). Отсюда следует, что по крайней мере некоторые формы иммунологической толерантности связаны с тем, что в популяции лимфоидных клеток возникают Т-клетки-супрессоры, блокирующие антителообразование в ответ на антигенный стимул. Проявление супрессорной активности Т-клеток наблюдается не только при состоянии толерантности. Ингибиторная функция Т-лимфоцитов выявлена и при развитии положительных иммунных реакций.

Действие Т-клеток-супрессоров наглядно демонстрируется, например, при иммунном ответе на тимуснезависимые антигены. Считалось, что при индукции антителогенеза к таким антигенам Т-клетки участия не принимают. Однако удаление Т-лимфоцитов тимэктомией или антилимфоцитарной сывороткой приводит к значительному увеличению антителообразования (Baker e. a., 1970; Barthold e. a., 1974a; Rotter, Trainin, 1974; Naor e. a., 1975). Ответ возвращается к норме, если вновь вводятся Т-клетки (Baker e. a., 1970; Rotter, Trainin, 1974).

Супрессивное влияние Т-клеток может быть выявлено и при развитии ответа к тимусзависимым антигенам. Показано, что добавление активированных Т-лимфоцитов подавляет ответ селезеночных клеток на чужеродные белки и гетерологичные эритроциты (Gershon e. a., 1972; На e. a., 1974; Burns e. a., 1975; Гамбаров и др., 1975; Khaitov e. a., 1976).

Т-супрессоры возникают в лимфоидной популяции при гиперактивации Т-клеток стимулирующими агентами. Их можно получить в культуре *in vitro*, инкубируя облученные Т-лимфоциты в течение 6—8 час с антигеном, причем для инкубации супрессорной активности обязательно использовать тот же самый антиген, против которого получают ответ (Taussig, 1974b). Супрессоры появляются также и при митогенной сти-

муляции Т-лимфоцитов (Shou e. a., 1976). Таким образом, ингибирующее влияние Т-клеток на иммунный ответ может быть как специфическим (Gershon, Kondo, 1971a; Katz, 1974; Kontiainen, Feldmann, 1976), так и неспецифическим (Taussig, 1974b). Не исключено, что Т-супрессия определяет некоторые виды антигенной конкуренции. Показано, что у В-мышей (тмэктомированных, облученных и восстановленных костным мозгом) феномен конкуренции антигенов отсутствует. Введение таким животным тимоцитов приводит к проявлению эффекта конкуренции при последовательной иммунизации реципиентов двумя антигенами (Gershon, Kondo, 1971b). Предполагается, что введение первого антигена вызывает появление Т-клеток-супрессоров, подавляющих индукцию иммунного ответа на второй антиген.

Ингибирующее влияние лимфоцитов было вскрыто при изучении закономерностей выработки аутоантител (Barthold e. a., 1974b), в явлении хронической аллотипической супрессии (Jacobson e. a., 1972), а также в реакциях клеточного иммунитета (Zembala, Asherson, 1973; Kilshaw e. a., 1975; Rich, Rich, 1976). Такая широкая распространенность супрессорной функции Т-клеток в различных иммунологических феноменах свидетельствует о важной регуляторной роли тимусзависимых лимфоцитов в реакциях клеточного и гуморального иммунитета.

Интересно отметить, что некоторые патологические состояния сопровождаются значительным усилением супрессорной функции Т-клеток. Так, ингибирующее влияние селезеночных клеток на иммунный ответ к эритроцитам барана было в 6—7 раз сильнее, если эти клетки брали от мышей с опухолями, а не от интактных животных (Гамбаров и др., 1975; Khaitov e. a., 1976). Функция Т-клеток-помощников при этом была снижена. Когда облученным реципиентам вместе с эритроцитами барана вводили нормальные В-клетки в смеси с Т-клетками от животных с опухолями, ответ был в 3—3,5 раза меньше, чем при переносе Т-лимфоцитов от здоровых доноров (Khaitov e. a., 1976). По-видимому, развитие опухоли сопровождается нарушением иммунорегуляторных механизмов с преобладанием функции Т-клеток-супрессоров.

Какие же характерные особенности свойственны супрессорным клеткам и что отличает их от других субпопуляций Т-лимфоцитов? Известно, что Т-супрессоры несут на своей поверхности Ly2, 3-антиген в отличие от клеток-помощников, несущих Ly1-антиген (Feldmann, 1975). Предполагается наличие на поверхности Т-клеток Fc-рецепторов (Playfair, 1974), а также рецепторов к гистамину (Shearer e. a., 1974). Отмечается устойчивость супрессорных клеток к кортикостероидам (Gershon e. a., 1972; Rotter, Trainin, 1974; Wu, Lance, 1974), хотя имеются данные об ингибирующей активности и кортизончувствительных тимоцитов (Lawrence, Weigle, 1976). Супрессорные Т-лимфоциты чувствительны к ионизирующей радиации. Состояние толерантности, выработанное введением массовных доз эритроцитов барана у крыс, снимается трансплантацией лимфоцитов нормальных доноров при условии, что толерантные реципиенты были предварительно облучены (McGregor e. a., 1967).

Супрессорные Т-клетки локализуются преимущественно в селезенке. Об этом свидетельствуют опыты с введенным облученным реципиентам тимоцитов, меченных ^{51}Cr , и последующей спленэктомией (Wu, Lance, 1974). Введенные тимоциты выявляются в основном в селезенке. Удаление такой селезенки увеличивает иммунный ответ, а добавление приготовленной из нее клеточной суспензии к нормальным селезеночным

клеткам приводит к подавлению ответа. Предполагается, что супрессорными свойствами обладают тимоциты, мигрирующие в селезенку, где создается микроокружение, необходимое для проявления их ингибирующей активности. Однако известны данные о выявлении Т-супрессоров в лимфатических узлах (Feldbuch, 1976) и среди лимфоцитов периферической крови (Shou e. a., 1976), что, возможно, связано с перемещением этих клеток в процессе миграции.

В настоящее время установлено, что среди периферических тимуса-зависимых лимфоцитов имеется по крайней мере две субпопуляции, различающиеся по локализации в лимфоидных органах и по другим изученным свойствам (Dyminski, Smith, 1974; Арцимович, Настоящая, 1976; Брондз, 1977). Одна из них, T_1 -популяция, образована сравнительно короткоживущими нерециркулирующими Т-лимфоцитами, локализованными главным образом в селезенке. К T_2 -популяции относятся долгоживущие рециркулирующие лимфоциты, которые обнаруживаются преимущественно в лимфатических узлах и в периферической крови. По-видимому, это зрелые Т-клетки, наиболее чувствительные к обработке антилимфоцитарной сывороткой *in vivo* и имеющие на своей поверхности относительно низкую плотность θ -антигена.

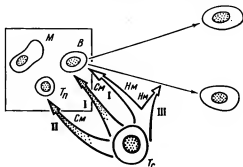
Учитывая, что популяция Т-клеток-супрессоров крайне чувствительна к обработке антилимфоцитарной сывороткой (Baker e. a., 1970; Barthold e. a., 1974b; Naor e. a., 1975), является, по-видимому, кортизоирезистентной (Gershon e. a., 1972; Rotter, Trainin, 1974) и имеет на клеточной поверхности низкую плотность θ -антигена (Gorczynski, 1974; Thomas e. a., 1975), ее следует отнести к популяции T_2 -лимфоцитов. Однако данные о преимущественной локализации супрессорных Т-клеток в селезенке (Wu, Lance, 1974; Kontiainen, Feldmann, 1976), а также факт частичной потери способности Т-клеток развивать супрессорную активность при тимэктоми у взрослых животных (Burns e. a., 1975) говорят о возможном участии T_1 -лимфоцитов в индукции Т-супрессии.

По всей вероятности, для проявления супрессорной функции Т-клеток необходимо взаимодействие между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов. Опыты по переносу различных типов клеток мышей C57BL реципиентам (CBA \times C57BL) F_1 показали, что введение клеток селезенки значительно подавляет иммунный ответ реципиентов к эритроцитам барана. Подобный перенос клеток лимфатических узлов не влияет на антителиобразование. В то же время совместное введение сингенных клеток селезенки и лимфатических узлов приводит к ослаблению ингибирующего эффекта селезеночных клеток, что свидетельствует о взаимодействии между субпопуляциями Т-лимфоцитов при развитии супрессорной активности (Гамбаров и др., 1975; Khaitov e. a., 1976).

Аналогичный вывод можно сделать на основании опытов, в которых Т-супрессоры получали путем культивирования клеток селезенки с высокими дозами антигена (Feldmann, Kontiainen, 1976). Супрессорная активность культивируемых клеток значительно снижается после введения донорам антилимфоцитарной сыворотки или в случае их тимэктоми во взрослом состоянии, т. е. после преимущественной элиминации T_2 - или T_1 -субпопуляций Т-лимфоцитов. Если же селезеночные клетки, полученные от мышей, подвергнутых таким обработкам, смешивали вместе и культивировали с антигеном, то наблюдалось восстановление супрессорной активности. Разделение этих клеточных суспензий миллипоровой мембраной с величиной пор 0,2 мкм не отменяло индукции супрессии,

Рис. 40. Возможные варианты действия специфических и неспецифических медиаторов Т-клеток-супрессоров (T_c) на индукцию иммунного ответа

I — прямое действие на В-клетку;
II — действие на Т-клетку-помощник;
III — подавление пролиферации клона антителообразующих клеток
Остальные обозначения те же, что на рис. 39



причем супрессоры выявлялись в той камере, где культивировались клетки селезенки тимэктомированных животных.

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что предшественники клеток-супрессоров сохраняются при тимэктоми у взрослых животных, чувствительны к обработке антилимфоцитарной сывороткой и являются, по-видимому, T_2 -лимфоцитами. Однако для проявления супрессорной функции им необходимо взаимодействие с T_1 -лимфоцитами, которое опосредуется гуморальным фактором.

Механизм действия Т-супрессоров на антителообразование пока не вполне ясен. Исследование динамики накопления антителообразующих клеток у мышей, иммунизированных пневмококковым полисахаридом, выявило усиление темпа пролиферации клеток-предшественников при обработке животных антилимфоцитарной сывороткой (Jones e. a., 1976). Опыты с использованием винбластина (ингибитора клеточной пролиферации) подтверждают антимитотический эффект Т-супрессоров при развитии иммунного ответа на тимуснезависимые антигены. Введение винбластина на 4-е сутки после иммунизации пневмококковым полисахаридом снижает количество антителообразующих клеток у животных, обработанных антилимфоцитарной сывороткой, и не влияет на антителообразование у мышей, не подвергавшихся такой обработке (Baker e. a., 1974). Другими словами, антимитотическое действие винбластина не проявляется, когда клеточная пролиферация уже подавлена Т-супрессорами. Таким образом, Т-супрессоры, очевидно, блокируют клеточное деление, осуществляя тем самым гомеостатический контроль за величиной клона антителообразующих клеток.

При развитии ответа на тимусзависимые антигены супрессорная функция Т-клеток осуществляется, по-видимому, в тесной взаимосвязи с действием клеток-помощников. Было показано, что появление супрессоров в популяции активированных тимусных клеток под влиянием антигена сопровождается выделением фактора, заменяющего Т-клетки-помощники при индукции иммунного ответа (Taussig, 1974a, b). Вполне вероятно, что существует механизм обратной связи, благодаря которому накопление стимулирующего Т-клеточного фактора подавляет функцию клеток-помощников и вызывает тем самым появление супрессорных Т-лимфоцитов. Известно, что ингибирующее действие Т-клеток проявляется лишь через некоторое время после индукции иммунного ответа (Thomas e. a., 1975). Предполагаемые точки приложения действия Т-клеток-супрессоров при развитии иммунного ответа изображены на рис. 40.

Таблица 12

Свойства гуморальных факторов, вырабатываемых Т-лимфоцитами при индукции гуморального иммунного ответа

Гуморальный фактор	Агент, стимулирующий выделение фактора	Чувствительность		Химическая природа	Молекулярный вес	Кодирование генами H-2-комплекса	Автор, год
		к нагреванию	к ферментам				
Специфический фактор Т-клеток, активирующий В-клетки	Специфический антиген	—	—	Иммуноглобулин	150 000	—	Feldmann, Basten, 1972; Feldmann e. a., 1973
				Белок неиммуноглобулиновой природы		Кодируется генами I-района	Taussig, 1974; Taussig e. a., 1975
Неспецифический фактор Т-клеток, кооперирующий с В-клетками	Аллоантигены, антигены другой специфичности, неспецифические митогены	Устойчива при 56° С 30 мин. Разрушается при 60° С через 60 мин	Устойчива к ДНКазе, РНКазе. Разрушается трипсином, проназой	—	30 000—60 000	—	Rubin, Coons, 1972; Rubin e. a., 1973; Waldmann, Munro, 1974
						Кодируется генами I-района	Armerding, Katz, 1974
						Не кодируется	Waldmann, e. a., 1976
Специфический фактор Т-клеток-супрессоров	Специфический антиген	—	Устойчив к ДНКазе, РНКазе. Разрушается трипсином, проназой	α-, β-глобулин	30 000—60 000	—	Okumura, Tada, 1974; Taniguchi e. a., 1976
				Иммуноглобулин	—	—	Feldmann, 1974
						Кодируется генами I-района	Taniguchi e. a., 1976
Неспецифический фактор Т-клеток-супрессоров	Антигены другой специфичности, неспецифические митогены	Устойчив при 70° С 30 мин. Разрушается при 80° С 30 мин	—	—	55 000—60 000	—	Thomas e. a., 1976
		Устойчив при 56° С 30 мин. Разрушается при 80° С 10 мин	Устойчив к ДНКазе, РНКазе. Разрушается трипсином, хемотрипсином	Гликопротеид	48 000—67 000	—	Tadakuma e. a., 1976

В настоящее время доказано, что супрессорное влияние Т-клеток на антителиогенез может осуществляться с помощью растворимого медиатора (или медиаторов). Разделение антителиопродукентов и Т-супрессоров миллипоровой мембраной не отменяет подавления антителиообразования (Feldmann, 1974; Ha e. a., 1974; Thomas e. a., 1975). Ингибирующей активностью обладают надосадочная жидкость, полученная после культивирования Т-супрессоров (Gorzynski, 1974; Ha e. a., 1974), а также экстракты из разрушенных ультразвуком клеток селезенки и тимуса мышей, дважды иммунизированных гемоцианином (Taniguchi e. a., 1976).

Химическая природа супрессирующих факторов малонзучена. Показано, что активные компоненты не разрушаются ДНКазой и РНКазой, но перевариваются трипсином и проназой (Okumura, Tada, 1974). По данным Фелдмана (Feldmann, 1974), фактор адсорбируется на сефарозе,

конъюгированной с антителами против катпа- и мя-целей. Однако другие авторы не получили подобных результатов (Okumura, Tada, 1974; Gorczynski, 1974). С помощью гельфильтрации на сефадексе G-100 определен молекулярный вес фактора, который оказался равным 30 000—60 000 (Okumura, Tada, 1974; Taniguchi e. a., 1976). Он разрушается при нагревании до 80° С в течение 30 мин, но выдерживает нагревание до 70° С (Thomas e. a., 1975). Показано, что образование супрессорного фактора Т-клеток кодируется I-IA- и (или) I-IB-субобластями I-области главного комплекса гистосовместимости (Taniguchi e. a., 1976). В табл. 12 суммированы основные свойства наиболее изученных стимулирующих и супрессирующих факторов, выделяемых Т-клетками при индукции гуморального иммунного ответа.

VII.2.2. В-клетки-супрессоры

Супрессивное влияние на иммунный ответ могут оказывать не только Т-лимфоциты. Было замечено, что если к смеси клеток костного мозга, тимуса и эритроцитов барана, которые вводятся летально облученным реципиентам, добавить клетки костного мозга иммунных доноров, то количество антителопродукентов в селезенках реципиентов значительно понижается (Miller, Cudkovich, 1970). Ингибирующий эффект клеток «иммунного» костного мозга, вероятно, связан с действием В-лимфоцитов. Это было показано в опытах по переносу сингенных лимфоидных клеток разного гистологического происхождения мышам линий СВА и С57BL, которые различаются по силе иммунного ответа на эритроциты барана. Трансплантация клеток костного мозга или лимфатических узлов вместе с эритроцитами барана мышам высокореагирующей линии СВА приводит к подавлению антителообразования. Введение этих типов клеток мышам низкореагирующей линии С57BL вызывает повышение ответа. Обработка доноров трансплантируемых клеток циклофосфамидом в дозе, избирательно элиминирующей В-лимфоциты, полностью отменяет эффект супрессии иммунного ответа у мышей СВА. Трансплантация большой дозы (10^7) В-лимфоцитов, полученных от В-мышей, подавляет иммунный ответ как у низкореагирующих, так и у высокореагирующих животных. Супрессия иммунного ответа не наблюдается при трансплантации клеток тимуса, кортизонрезистентных тимоцитов или активированных Т-клеток (Петров и др., 1975, 1976; Petrov, Khaitov, 1977). Ингибирующее влияние В-клеток, чувствительных к действию циклофосфамида, отмечалось также при развитии кожных реакций гиперчувствительности замедленного типа к динитробензолу и овальбумину (Katz e. a., 1974).

Изложенные результаты демонстрируют возможность супрессии иммунного ответа В-лимфоцитами, которые, очевидно, так же как и Т-лимфоциты, участвуют в регуляции иммунных реакций, развивающихся в организме в ответ на антигенный стимул.

Данные по супрессорным свойствам В-клеток были получены и при индукции иммунного ответа к эритроцитам барана в культуре *in vitro*. Добавление сингенных клеток костного мозга в культуру клеток селезенки вместе с эритроцитами барана приводит к угнетению антителообразования. Обработка клеток костного мозга анти- θ -сывороткой и компонентом не отменяет их супрессивного действия (Singhal e. a., 1972;

Drury, Singhal, 1974). В то же время предварительная инкубация клеток костного мозга с анти-IgG-сывороткой и комплементом снижает супрессивную активность этих клеток в 2—4 раза (Петров и др., 1977).

Установлено, что супрессорное действие клеток костного мозга на антителообразование опосредуется гуморальным фактором с молекулярным весом, равным 1000 (Duwe, Singhal, 1976).

Сравнительное изучение ингибирующего влияния клеток костного мозга мышей СВА и С57BL на индукцию иммунного ответа к эритроцитам барана в культуре *in vitro* позволило установить зависимость супрессорной активности клеток от генотипа донора (Петров и др., 1976). Показано, что клетки костного мозга генотипа С57BL производят больший ингибирующий эффект, чем клетки генотипа СВА. Повышенная супрессорная активность клеток костного мозга низкореагирующей линии С57BL может быть одним из факторов, ограничивающих у мышей данного генотипа развитие высокого иммунного ответа. Это позволяет предположить, что клетки-супрессоры принимают участие в реализации генетических различий при иммунном ответе высоко- и низкореактивных особей.

Имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные не позволяют судить о конкретных механизмах индуцированной В-клетками супрессии иммунного ответа. Не исключено, что наблюдаемая ингибиторная функция В-лимфоцитов опосредуется действием Т-клеток. Можно предположить, что избыточное количество В-лимфоцитов приводит к созданию сигнала, включающего в работу Т-клетки-супрессоры по механизму обратной связи, что вызывает снижение антителообразования. Для выяснения способов проявления ингибирующего влияния В-клеток на иммунный ответ необходимо дальнейшее экспериментальное изучение этого вопроса.

VII.2.3. Супрессорная функция макрофагов

Супрессорная активность макрофагов выявлена в опытах по изучению влияния различного количества клеток перитонеального экссудата на синтез ДНК в культуре клеток селезенки, стимулированных антигеном. Если соотношение числа макрофагов и лимфоцитов меньше 1 : 5, наблюдается усиление включения ³H-тимидина в ДНК селезеночных клеток. Увеличение соотношения макрофагов и лимфоцитов до 1 : 5—1 : 3 приводит к подавлению пролиферативного ответа (Parkhaus, Dutton, 1966; Waldman, Gottlieb, 1973). Угнетение синтеза ДНК наблюдается уже через 4 часа после добавления в культуру макрофагов, ингибция достигает 95% и является обратимой (Waldman, Gottlieb, 1973). Подобные результаты были получены и при оценке антителообразования по числу образующихся клеток в культуре. Добавление $2 \cdot 10^5$ макрофагов к 10^7 клеток селезенки усиливало иммунный ответ к эритроцитам барана в культуре *in vitro* в 3—4 раза. Увеличение дозы макрофагов до $2 \cdot 10^6$ приводило к резкому угнетению иммунного ответа (Hoffmann, 1970).

Приведенные факты демонстрируют возможность подавления иммунного ответа под влиянием макрофагов. Механизм супрессорного действия этих клеток малознучен. Ингибирующее влияние макрофагов на антителогенез может быть связано с передачей сигналов другим клеткам, например Т-супрессорам. В то же время не исключено и прямое воздей-

стве макрофагов на антителообразующие клетки или их предшественники.

Существуют доказательства наличия гуморального фактора, опосредующего супрессивное влияние макрофагов на иммунный ответ (Diener *et al.*, 1970; Waldman, Gottlieb, 1973; Kasahara, Shioiri-Nakano, 1976). Этот фактор диализуем, выдерживает нагревание до 80°С в течение одного часа, молекулярный вес его составляет 500—1000 (Diener *et al.*, 1970; Kasahara, Shioiri-Nakano, 1976). В то же время имеются данные, показывающие, что для проявления супрессорного действия макрофагов необходим непосредственный клеточный контакт (Parkhouse, Dutton, 1966).

Таким образом, супрессия иммунного ответа, представляющая собой один из основных компонентов иммунорегуляторного механизма, осуществляется, очевидно, при участии различных типов клеток. Наиболее подробно в настоящее время охарактеризована супрессорная функция Т-лимфоцитов. Их называют нередко клетками-регуляторами. Однако в регуляции иммунных реакций принимают участие и В-лимфоциты, и макрофаги. В зависимости от конкретных условий эти клетки индуцируют различные сигналы, контролирующие развитие иммунной реакции.

VII.3. КООПЕРАЦИЯ КЛЕТОК НА УРОВНЕ ЗРЕЛЫХ АНТИТЕЛОПРОДУЦЕНТОВ

Описанные выше межклеточные кооперативные процессы протекают при индукции иммунного ответа и в начальный период его развития. Иницирующие клеточные взаимодействия обеспечивают активацию предшественников антителопродуцентов, их вступление в пролиферацию и иммунопоэтическую дефференцировку. Супрессирующие кооперативные процессы регулируют формирование клона антителопродуцентов и определяют, по-видимому, силу иммунной реакции. В результате всех этих взаимодействий, протекающих в индуктивную фазу иммунного ответа, клон клеток-предшественников дает потомство зрелых антителопродуцентов, синтезирующих и секретирующих антитела в продуктивный период.

В связи с тем, что изучению иницирующих взаимодействий посвящены сотни работ, создалось впечатление, что кооперация клеток необходима лишь на начальных этапах развития иммунной реакции, в момент ее запуска, вступившие же в антителогенез клетки выполняют свою функцию без каких-либо дополнительных сигналов. Однако это не так. Выработка антител в популяции зрелых антителопродуцентов на пике иммунного ответа может быть увеличена или уменьшена путем добавления к ним других типов клеток (Petrov, Mikhailova, 1972; Tada *et al.*, 1973; Gorczynski, 1974). Это указывает на то, что межклеточная кооперация необходима не только для индукции иммунной реакции. Взаимодействие между различными типами клеток происходит также на последующих ее этапах, и в частности в продуктивную фазу.

VII.3.1. Гипотеза о двух этапах взаимодействия клеток в иммунном ответе

Опыты по совместному культивированию клеток лимфатических узлов, полученных на пике вторичного иммунного ответа, с клетками костного мозга неиммунизированных доноров показали, что синтез антител в смешанной культуре в 2—3 раза превышает их выработку в монокультуре. Синтез неспецифических иммуноглобулинов повышается при этом не более чем в 1,5 раза, а синтез водорастворимых белков неиммуноглобулиновой природы вовсе не увеличивается (Petrov e. a., 1975). Схема постановки изложенных опытов изображена на рис. 41.

Использование метода локального гемолиза в геле позволило установить, что эффект стимуляции обусловлен увеличением числа клеток, вырабатывающих антитела той же специфичности (Mikhailova e. a., 1973; Степаненко, Михайлова, 1975). Следует подчеркнуть, что максимальная стимуляция наблюдается в случае использования клеток лимфатических узлов, полученных на 4-е сутки после вторичной иммунизации доноров, т. е. на высоте иммунного ответа. На 2-е или 6-е сутки, когда в иммунной популяции присутствует очень мало зрелых антителообразующих клеток, эффект усиления антителообразования выражен слабо или вовсе отсутствует (Petrov, Mikhailova, 1972). Увеличение выработки антител в смешанной культуре наблюдается также и при совместном культивировании клеток лимфатических узлов иммунных доноров с клетками селезенки, эмбриональной печени или плазмоцитомы МОПС-21. Эффект стимуляции отсутствует, если к клеткам иммунных лимфатических узлов добавляются клетки печени взрослого животного, почки, саркомы, L-клетки, перевиваемый штамм клеток СОЦ. Это указывает на то, что увеличение числа антителообразующих клеток в смешанной культуре является следствием кооперации каких-то форм из популяции зрелых антителопродуцентов с лимфоидными или кроветворными клетками.

Что же происходит в результате этих кооперативных процессов, увеличивается ли число антителообразующих клеток в иммунной популяции, или костномозговые клетки неиммунных доноров подключаются к синтезу антител под влиянием зрелых антителопродуцентов? Ответ на этот вопрос получен в опытах с разделением клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга миллипоровой мембраной (Захарова, Галкина, 1974; Petrov e. a., 1975). Культивирование проводили в двухкамерной ячейке. В верхнюю камеру помещали клетки лимфатических узлов иммунных доноров, в нижнюю — клетки интактного костного мозга или культуральную среду. После окончания инкубации определяли количество антител, синтезированных клетками в процессе культивирования, и число антителопродуцентов по обе стороны мембраны. При разделении клеток миллипоровой мембраной с диаметром пор 25 нм наблюдался полноценный эффект стимуляции антителообразования. Использование целлофановой мембраны отменяло проявление эффекта (Захарова, Галкина, 1974). В камере, где культивировали клетки костного мозга, антителопродуценты всегда отсутствовали. В верхней камере, где культивировали клетки иммунных лимфатических узлов, количество антителопродуцентов увеличивалось втрое, если в нижней камере находились клетки костного мозга, а не культуральная среда.

Эти опыты позволили сделать два существенных вывода. Во-первых,

Рис. 41. Схема постановки опытов по совместному культивированию клеток лимфатических узлов (ЛУ) иммунных доноров с клетками интактного костного мозга (КМ)

I — культивирование в течение 18 час;
II — определение меченых антител (Гуранч и др., 1968) и выявление бляшкообразующих клеток (Жегне, Nordin, 1963)

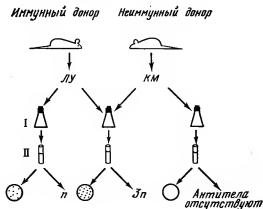
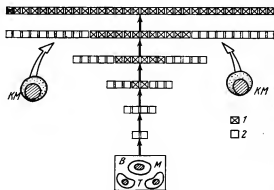


Рис. 42. Схема развития кооперации клеток на уровне зрелых антителопродукторов

1 — антителообразующие клетки, секретирующие антитела;
2 — «молчащие» клетки клона;
КМ — клетки костного мозга, вырабатывающие фактор САП, действующий на «молчащие» клетки (широкая стрелка)



взаимодействие клеток в смешанной культуре осуществляется не путем непосредственного контакта, а при участии недифференцируемого гуморального фактора САП — стимулятора антителопродукторов. Во-вторых, дополнительное количество антителопродукторов появляется в популяции иммунных лимфатических узлов под влиянием клеток костного мозга, а не наоборот. Последний вывод был подтвержден также в опытах по совместному культивированию клеток мышей разных генотипов. Обработка смешанных культур Н-2-изоантисыворотками, избирательно элиминирующими или клетки лимфатических узлов, или клетки костного мозга, показала, что в иммунной популяции появляются дополнительные антителопродукторы (Петров и др., 1975).

Анализ изложенных экспериментальных данных привел к созданию гипотезы о наличии особого типа клеточного взаимодействия в иммунном ответе — кооперации на уровне зрелых антителопродукторов (Петров, Mikhailova, 1972). В отличие от кооперативных процессов на уровне клеток-предшественников, включающих иммунопоз, взаимодействие клеток на уровне зрелых антителопродукторов развивается в продуктивную фазу иммунного ответа и обеспечивает, по-видимому, регуляцию антителообразования в этот период.

Предполагается, что индукция иммунного ответа и последующие этапы его развития обеспечиваются двумя разными видами межклеточной кооперации (рис. 42). Взаимодействие типа макрофаг — Т-лимфоцит — В-лимфоцит, включающее иммунопозитивскую дифференцировку клеток-предшественников, вызывает развитие и размножение антителообразующих клеток (кооперация по вертикали на рис. 42). На последующих стадиях иммуногенеза, когда появилось значительное количество клеток, начавших выработку антител, развивается второй тип клеточной кооперации — взаимодействие на уровне зрелых антителопродукторов, в результате которого в антителообразовании вовлекаются новые, до этого не вырабатывавшие антитела, но готовые к белковому синтезу клетки (кооперация по горизонтали на рис. 42). В данной схеме сделано допущение, что к каждому антителопродуктору подключаются две другие клетки. В этом случае количество антителопродукторов будет увеличиваться в 3 раза, что в наибольшей степени приближается к полученным экспериментальным данным в смешанных культурах (Petrov, Mikhailova, 1972).

В последние годы появились работы, показывающие возможность подавления антителообразования в продуктивную фазу иммунного ответа под влиянием Т-лимфоцитов. Выявлена субпопуляция Т-клеток с низкой плотностью θ -антигена, которая оказывала супрессивный эффект на выработку антител в культуре клеток селезенки, полученных от мышей на пике иммунного ответа к эритроцитам барана (Gorczyński, 1974). Уменьшение антителообразования отмечалось и при введении иммунизированным крысам в продуктивную фазу ответа Т-клеток или экстрактов тимуса, полученных от гипериммунных доноров (Tada *et al.*, 1973). Снижение интенсивности синтеза антител и количества антителообразующих клеток наблюдалось и при добавлении Т-супрессоров в культуру клеток лимфатических узлов, полученных от мышей на высоте вторичного иммунного ответа к гамма-глобулину лошади или эритроцитам барана (Михайлова и др., 1976). Удаление Т-лимфоцитов с высокой плотностью θ -антигена из популяции клеток иммунных лимфатических узлов приводило к подавлению интенсивности синтеза антител на 70%, что, очевидно, связано с ингибирующим действием оставшихся в популяции Т-супрессоров, несущих низкую плотность θ -антигена. Уменьшение синтеза антител на 30% наблюдалось также и при удалении прилипающих клеток (Михайлова, Захарова, 1976).

Таким образом, в продуктивную фазу иммунного ответа возможно как усиление, так и угнетение антителообразования под влиянием различных типов клеток, что подтверждает гипотезу о наличии кооперативных процессов на уровне зрелых антителопродукторов.

Следует подчеркнуть, что рассматриваемый тип клеточной кооперации выявляется не только в системе *in vitro*. Введение сингенных клеток костного мозга мышам на пике вторичного иммунного ответа к эритроцитам барана приводит к увеличению количества антителопродукторов в лимфатических узлах реципиентов в 1,6 раза. При последующем культивировании клеток лимфатических узлов этих животных с клетками интактного костного мозга наблюдается значительно меньшая стимуляция антителообразования, чем при использовании лимфатических узлов мышей, которым не вводили костный мозг (Степаненко, 1978). Двукратное усиление антителообразования было получено также А. А. Горуховым при введении клеток костного мозга мышам в продуктивную фазу первичного иммунного ответа (цит. по: Петров и др., 1972).

VII.3.2. Особенности кооперации

Взаимодействие клеток на уровне зрелых антителопродуцентов имеет особенности. Для данного типа клеточной кооперации характерно отсутствие аллогенного барьера. В отличие от кооперации клеток при индукции иммунного ответа процессы взаимодействия в продуктивную фазу протекают как между сингенными, так и между аллогенными клетками. При совместном культивировании клеток иммунных лимфатических узлов и нитактичного костного мозга, полученных от мышей разных генотипов, эффект стимуляции антителообразования был такой же, как и в случае использования доноров одного и того же генотипа (Михайлова и др., 1972; Степаненко, Михайлова, 1975). Об этом же свидетельствуют данные, полученные в опытах по изучению взаимодействия аллогенных лимфоцитов с антителообразующими клетками и их предшественниками. Добавление клеток лимфатических узлов мышей СВА к клеткам селезенки мышей C57BL в соотношении 1:1 и введение этой смеси вместе с эритроцитами барана облученным реципиентам (CBA × C57BL) F₁ приводило к инаktivации предшественников антителообразующих клеток. Однако в случае трансплантации лимфоцитов мышей СВА через 1—3 дня после введения клеток селезенки мышей C57BL с эритроцитами барана наблюдался кооперативный эффект и число антителопродуцентов увеличивалось в 3—4 раза (Манько и др., 1976). Очевидно, что кооперация аллогенных клеток возможна лишь на поздних стадиях индуктивной фазы иммунного ответа и в продуктивный период.

Другой особенностью данного типа клеточной кооперации является сравнительно быстрое проявление эффекта. Увеличение интенсивности синтеза антител и количества антителообразующих клеток в смешанной культуре наблюдается уже через 3—6 час после начала культивирования. За это время клетки костного мозга вырабатывают, по-видимому, достаточное количество фактора, необходимое для стимуляции антителообразования в популяции клеток иммунных лимфатических узлов.

Следует отметить также, что взаимодействие клеток в продуктивную фазу иммунного ответа не зависит от их пролиферации. Увеличение количества антителопродуцентов в иммунной популяции происходит без деления. Выработка стимулирующего фактора клетками костного мозга также не связана с их пролиферативной активностью. Об этом свидетельствуют следующие экспериментальные данные.

Интенсивность включения ¹⁴C-тимидина в ДНК в смешанных и одноклассовых культурах была практически одинаковой, в то время как число антителообразующих клеток в смешанной культуре увеличивалось в 2—3 раза по сравнению с их числом в монокультуре. Эффект стимуляции выработки антител в смешанной культуре наблюдался и при добавлении 5-бромдезоксиридина в дозах, полностью блокирующих синтез ДНК. Облучение клеток костного мозга не отменяло их стимулирующего действия (Михайлова, 1974).

Таким образом, в отличие от кооперации при индукции иммунного ответа, включающей пролиферацию клеток-предшественников, процессы взаимодействия, развивающиеся в продуктивную фазу, обеспечивают увеличение пула антителообразующих клеток без деления.

Характерные особенности имеет и гуморальный фактор, стимулирующий антителообразование на пике иммунного ответа. Большинство

изученных медиаторов клеточного и гуморального иммунитета вырабатывается лимфоцитами под влиянием антигенных или митогенных стимуляторов и является продуктами Т-клеток (Bloom, 1971; Pick, Turk, 1972; Waksman, Hamba, 1976).

Из известных факторов один лишь тимозин выделяется эпителиальными клетками тимуса в процессе нормального метаболизма и выполняет важнейшую иммунологическую функцию становления Т-системы иммунитета. Фактор, обеспечивающий увеличение количества зрелых антителопродукторов, синтезируется клетками костного мозга при отсутствии какой-либо стимуляции. Методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности бычьего сывороточного альбумина было показано, что клетки, ответственные за синтез фактора, концентрируются в легких фракциях и являются, по-видимому, бластными формами. В тяжелых фракциях были выявлены клетки, оказывающие ингибирующее действие на синтез антител в зрелых антителопродукторах, однако в исходной популяции клеток костного мозга их супрессивная активность не проявлялась (Михайлова, 1977).

Гуморальный фактор костного мозга, стимулирующий антителогенез в продуктивную фазу, термостабилен. Его активность сохраняется при нагревании до 56°C в течение 30 мин и снижается на 30% при 80°C. Супернатанты, полученные после культивирования клеток костного мозга, проявляют стимулирующую активность вплоть до разведения 1:16.

Дальнейшее изучение свойств стимулирующего фактора костного мозга позволит выяснить и другие его физико-химические характеристики, а выделение активной субстанции в чистом виде может иметь и практическое значение.

VII.3.3. Предполагаемые механизмы взаимодействия клеток в продуктивную фазу иммунного ответа

Имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные пока не дают возможности представить точную последовательность событий, развивающихся в процессе кооперации клеток в продуктивную фазу иммунного ответа. Для расшифровки механизма взаимодействия клеток на уровне зрелых антителопродукторов требуется дальнейшее глубокое изучение этого явления. Однако на основании результатов, полученных в системе *in vitro*, можно высказать некоторые предположения относительно способов осуществления межклеточных связей, обеспечивающих регуляцию антителообразования на высоте иммунной реакции.

Как указывалось выше, одним из проявлений взаимодействия клеток на уровне зрелых антителопродукторов является увеличение выработки антител в культуре клеток иммунных лимфатических узлов под влиянием клеток костного мозга. Этот эффект может быть связан с подключением к синтезу антител новых клеток, ранее не вырабатывавших антитела, но обладающих аппаратом белкового синтеза. В таком случае приходится допустить, что среди зрелых антителопродукторов на пике иммунного ответа присутствует «молчащая» популяция, синтез антител в которой заблокирован. Включение антителообразования в этих клетках происходит при участии гуморального фактора, вырабатываемого костным мозгом. В литературе имеются указания на наличие

такой «молчащей» популяции в культуре лимфондных клеток (Ярвелов, Пинегин, 1973; Пинегин, 1974, см. также раздел V).

Другим возможным способом усиления антителообразования в продуктивную фазу иммунного ответа может быть удлинение времени работы уже имеющихся антителообразующих клеток. В настоящее время нет полной ясности относительно механизмов прекращения синтеза антител в плазматической клетке. Вполне вероятно, что фактор, вырабатываемый клетками костного мозга, принимает участие в процессах, связанных с регуляцией длительности антителообразования в отдельных антителообразующих клетках на пике иммунного ответа.

Можно предположить также, что для нормальной антителопродукции в иммунной популяции необходимо присутствие определенного продукта, вырабатываемого клетками костного мозга. В условиях организма этот продукт постоянно поставляется в периферические лимфондные органы благодаря процессам клеточной миграции. При помещении клеток лимфатических узлов в культуру *in vitro* его поставка прекращается. Поэтому добавление костного мозга в культуру клеток иммунных лимфатических узлов приводит к усилению антителообразования.

Какие предположения могут быть высказаны относительно того, как осуществляется стимулирующее влияние гуморального фактора костного мозга на антителообразующие клетки в иммунной популяции? Фактор может действовать как прямым путем, так и при участии других типов клеток, снимая или предотвращая, например, ингибирующее влияние супрессоров.

Опыты по совместному культивированию клеток иммунных лимфатических узлов с клетками костного мозга и Т-супрессорами, полученными по методу Тауссига (Taussig, 1974b), показали, что в присутствии клеток костного мозга ингибиторная функция Т-лимфоцитов не проявляется. Клетки же костного мозга оказывают свое стимулирующее действие на антителообразование независимо от того, добавлены в культуру Т-супрессоры или нет (Михайлова и др., 1976). На основании этих результатов можно предположить, что стимулирующий фактор костного мозга конкурирует с супрессивной активностью Т-лимфоцитов, обладая, например, большим сродством к поверхностным рецепторам клеток-мишеней. Возможно также, что фактор костного мозга инактивирует эффекторную молекулу, вырабатываемую Т-супрессорами, или снимает супрессию с заблокированных зрелых клеток, включая в них синтез антител. Если это так, то регуляция продуктивной фазы иммунного ответа может обеспечиваться, по-видимому, взаимодействием стимулирующих и супрессирующих клеток, которое определяет интенсивность антителообразования в этот период.

Изложенные выше предположения могут пока рассматриваться как рабочие гипотезы для дальнейшего изучения процессов клеточной кооперации в продуктивную фазу иммунного ответа. Тонкие механизмы взаимодействия клеток, протекающего как при индукции, так и в последующие этапы развития иммунной реакции, еще неизвестны, а существующие гипотетические представления требуют всестороннего экспериментального подтверждения. Однако приведенные данные позволяют говорить о принципиально новой роли клеток костного мозга в иммунном ответе.

Костный мозг является не только источником В-клеток-предшественников при индукции антителогенеза. Клетки костного мозга, очевидно,

принимают участие в регуляции иммунного ответа на всех его этапах, и в частности в продуктивную фазу. Способность клеток костного мозга оказывать супрессирующее влияние при индукции иммунного ответа и стимулировать антителогенез в продуктивную фазу говорит о его важной регуляторной роли. По аналогии с Т-помощниками и Т-супрессорами, возможно, существуют В-помощники и В-супрессоры, которые подобно Т-лимфоцитам, регулируют развитие иммунной реакции. Не случайно, например, что, как и в случае Т-лимфоцитов, супрессорная функция клеток костного мозга более радиочувствительна, чем стимулирующая (Михайлова, 1974), и проявляются эти функции в различные моменты развития иммунного ответа.

Миграция клеток костного мозга в периферические лимфоидные органы обеспечивает поступление определенных клеточных форм в места активного антителообразования. Известно, что иммунизация животного вызывает усиление процессов миграции (Хантов, 1975), а клетки костного мозга, полученные от иммунных доноров, оказывают меньший стимулирующий эффект на выработку антител в зрелой иммунной популяции, чем клетки костного мозга интактных животных (Петров, Михайлова, 1974). По-видимому, введение антигена вызывает миграцию из костного мозга в периферические лимфоидные органы тех клеток, которые принимают участие в регуляции антителообразования.

Следует подчеркнуть, что стимулирующее действие костного мозга избирательно направлено на синтез иммуноглобулинов. Как указывалось выше, в смешанной культуре клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга увеличивается лишь синтез антител, и в меньшей степени — синтез неспецифических иммуноглобулинов. Синтез же белков неиммуноглобулиновой природы остается таким же, как и в монокультуре. Если вместо клеток иммунных лимфатических узлов в культуру помещаются клетки почки, не синтезирующие иммуноглобулины, никакого увеличения белкового синтеза под влиянием клеток костного мозга также не наблюдается (Михайлова, 1977).

Эти результаты свидетельствуют о том, что стимулирующий гуморальный фактор, вырабатываемый клетками костного мозга, не является регулятором общего клеточного метаболизма, а представляет собой субстанцию, действующую избирательно на синтез иммуноглобулинов и особенно на синтез специфических антител. Все это подчеркивает важную роль клеточной кооперации на уровне зрелых антителопродукторов в развитии иммунного ответа и необходимость ее дальнейшего изучения.

Литература

- Анфалова Т. В., Галактионов В. Г. Макрофаг — третий тип взаимодействующих иммунокомпетентных клеток. — Мед. реф. журн., 1975, 21, с. 23—31.
- Арцимович Н. Г., Настоящая Н. Н. Современные представления об иммунологической толерантности. — Усп. соврем. биол., 1976, 82, с. 403—416.
- Брондз Б. Д. Клеточные основы иммунологического распознавания I. Соотношение и кооперативное взаимодействие между субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов в ходе первичного иммунологического распознавания. — Усп. соврем. биол., 1977, 89, с. 219—235.
- Галактионов В. Г., Анфалова Т. В. Сингенные и аллогенные отношения при макрофагальной индукции иммунного ответа у мышей разных генотипов. — Журн. общ. биол., 1974, 35, с. 365—375.

- Галактионов В. Г., Анфалова Т. В., Моргунов О. И. Анализ индуцирующей способности несинтезирующих макрофагов, обработанных РНК селезенки донорского и реципиентского типов.— Докл. АН СССР, 1974, 215, р. 1226—1239.
- Гамбаров С. С., Петров Р. В., Хаитов Р. М., Наримов А. Ш. Повышение активности селезеночных клеток-супрессоров у мышей при опухолевом росте.— Докл. АН СССР, 1975, 224, р. 1196—1197.
- Гурвич А. Е., Сидорова Е. В. и др. Использование изотопного и иммунохимического методов в изучении синтеза антител, неспецифических γ -глобулинов и других белков.— В кн.: Иммунохимический анализ. М., «Медицина», 1968, с. 243—245.
- Евдаков В. П., Кабанов В. А., Кожина Е. В. и др. Влияние синтетических полиамфолитов на взаимодействие Т- и В-лимфоцитов.— Докл. АН СССР, 1975, 224, р. 464—467.
- Захарова Л. А., Галкина Н. С. Взаимодействие *in vitro* клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга, разделенных миллипоровой мембраной.— Бюл. эксперим. биол., 1974, 9, с. 67—69.
- Манько В. М., Петров Р. В., Кудряшов В. М., Руднева Т. Б. Взаимодействие аллогенных лимфоцитов и клеток-предшественников при первичном и вторичном иммунном ответе.— Онтогенез, 1976, 7, с. 123—130.
- Михайлова А. А. Влияние радиации и количественного соотношения взаимодействующих клеток на эффект стимуляции синтеза иммуноглобулинов в смешанной культуре.— Радиобиология, 1974, 14, с. 63—67.
- Михайлова А. А. Новый тип взаимодействия клеток в иммунном ответе: кооперация на уровне зрелых антителопродуцентов.— Мед. реф. журн., 1977, 4, с. 19—25.
- Михайлова А. А., Захарова Л. А. Роль различных типов клеток в эффекте стимуляции синтеза иммуноглобулинов в смешанной культуре.— Бюл. эксперим. биол., 1976, 6, с. 700—702.
- Михайлова А. А., Захарова Л. А., Петров Р. В. Синтез антител и неспецифических γ -глобулинов в смешанных культурах сингенных и аллогенных лимфоидных клеток.— Докл. АН СССР, 1972, 203, с. 948—950.
- Михайлова А. А., Петров Р. В., Степаненко Р. Н. Роль Т-супрессоров в эффекте стимуляции антителообразования на уровне зрелых антителопродуцентов.— Докл. АН СССР, 1976, 224, с. 247—249.
- Петров Р. В. Эффекты взаимодействия иммунологически несовместимых клеток кроветворных тканей.— Труды 12-го Междунар. конгресса по переливанию крови. М., «Медицина», 1969, с. 192—208.
- Петров Р. В. Формы взаимодействия генетически различающихся клеток лимфатических тканей (трехклеточная система иммуногенеза).— Усп. соврем. биол., 1970, 69, с. 261—271.
- Петров Р. В., Гвоздецкий А. Н., Горюхов А. А. и др. Изучение механизмов действия гепарина и поли-4-винилпиридина на иммунопоэз.— Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1974, 11, 37—40.
- Петров Р. В., Михайлова А. А. Синтез иммуноглобулинов в смешанных культурах клеток лимфатических узлов и костного мозга, полученных от иммунных доноров.— Докл. АН СССР, 1974, 215, с. 220—222.
- Петров Р. В., Степаненко Р. Н., Михайлова А. А. Роль отдельных клеточных популяций в эффекте стимуляции антителообразования в смешанной культуре клеток иммунных лимфатических узлов и интактного костного мозга.— Докл. АН СССР, 1975, 220, с. 230—232.
- Петров Р. В., Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И., Сидорович И. Г. Супрессия антителогенеза костно-мозговыми В-лимфоцитами в культуре клеток селезенки мышей разных генотипов.— Докл. АН СССР, 1977, 233, с. 745—748.
- Петров Р. В., Хаитов Р. М., Батырбеков А. А. Супрессивное действие сингенных В-клеток на иммунный ответ у мышей, относящихся к высоко или низко реагирующим генотипам.— Докл. АН СССР, 1976, 226, с. 1446—1448.
- Петров Р. В., Хаитов Р. М., Кожина Е. В. и др. Усиление кооперации Т- и В-лимфоцитов в иммунном ответе и индукция антителогенеза у В-мышей.— Цитология, 1975, 17, с. 321—325.
- Петров Р. В., Чередеев А. Н., Михайлова А. А., Сидорович И. Г. Взаимодействие и кооперация клеток в иммунном ответе.— В кн.: Общие вопросы патологии. Т. 3. М., «Медицина», 1972, с. 108—154.
- Пинегин Б. В. Изучение динамики антителообразующих и розеткообразующих клеток *in vitro*. Автореф. докт. дис. М., 1974.
- Степаненко Р. Н. Изучение влияния клеток костного мозга на антителообразование в продуктивную фазу иммунного ответа. Автореф. канд. дис. М., 1978.
- Степаненко Р. Н., Михайлова А. А. Увеличение числа антителопродуцентов при совместном культивировании клеток лимфатических узлов иммунизированных животных с клетками интактного костного мозга.— Бюл. эксперим. биол., 6, 1975, 76—79.

- Фонталиш Л. Н., Певницкий Л. А., Краскина Н. А. Экспериментальный анализ происхождения антителообразующих клеток в селезенке интактного реципиента после трансплантации ему клеток иммунизированных доноров.—Бюл. эксп. биол., 1967, 64, с. 108—113.
- Хайтов Р. М. Миграция Т- и В-лимфоцитов и иммунный ответ.—Мед. реф. журн., 1975, 21, с. 26—43.
- Ярелов Б. Н., Пинегин Б. В. Влияние актиномицина D и пуриномина на анти-телообразование в короткоживущих агаровых культурах лимфоидных клеток.—Журн. микробиол., 1973, 3, с. 38—80.
- Andersson J., Sjöberg O., Möller G. Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides.—Europ. J. Immunol., 1972, 2, p. 349—354.
- Armerding D., Katz D. H. Activation of T and B lymphocytes in vitro. II. Biological and biochemical properties of an allogeneic effect factor (AEF) active in triggering specific B lymphocytes.—J. Exptl Med., 1974, 140, p. 19—37.
- Armerding D., Sacks D. H., Katz D. H. Activation of T and B lymphocytes in vitro. III. Presence of Ia determinants on allogeneic effect factor (AEF).—J. Exptl Med., 1974, 140, p. 1717—1722.
- Askonas B. A., Jaroskova L. Antigen in macrophages and antibody induction.—In: Mononuclear phagocytes. New York—London, Acad. Press, 1970, p. 505—515.
- Askonas B. A., Rhodes J. M. Immunogenicity of antigen-containing ribonucleic acid preparations from macrophages.—Nature, 1965, 205, p. 470—472.
- Baker P. W., Barth R. F., Stashak P. W., Amsbaugh D. F. Enhancement of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharides in mice treated with antilymphocyte serum.—J. Immunol., 1970, 104, p. 1313—1315.
- Baker P. J., Stashak P. W., Amsbaugh D. F., Prescott B. Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. II. Mode of action of thymic-derived suppressor cells.—J. Immunol., 1974, 112, p. 404—409.
- Barthold D. R., Kysella S., Steinberg A. D. Decline in suppressor T cell function with age in female NZB mice.—J. Immunol. 1974a, 112, p. 9—16.
- Barthold D. R., Prescott B., Stashak P. W. e. a. Regulation of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. III. Role of regulatory T cells in the development of an IgG and IgA antibody response.—J. Immunol., 1974b, 112, p. 1042—1050.
- Barton M. A., Diener E. A new perspective on B cell triggering: control of the immune response by organizational changes in the lipid bilayer.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 5—22.
- Berenbaum M. C. Immunosuppressive agents.—Pharmac. J., 1969, 203, p. 671—679.
- Bloom R. B. In vitro approaches to the mechanism of cell mediated immune reactions.—Adv. Immunol., 1971, 13, p. 101—208.
- Bretcher P. A. The two signal model for B cell induction.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 37—48.
- Bretcher P. A., Cohn M. Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen.—Nature, 1968, 220, p. 444—446.
- Burns F. D., Marrack P. C., Kappler J. W., Janeway C. A. Functional heterogeneity among the T-derived lymphocytes of the mouse. IV. Nature of spontaneously induced suppressor cells.—J. Immunol., 1975, 114, p. 1345—1347.
- Chan E. L., Mishell R. L., Mitchell J. F. Cell interaction in immune response in vitro: requirement for theta carrying cells.—Science, 1970, 170, p. 1215—1217.
- Claman H. N., Chaperon E. A., Triplett R. F. Thymus-marrow cell combinations—synergism in antibody production.—Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 1966, 122, 1167—1172.
- Coutinho A., Möller G. Immune activation B cells: evidence for «one nonspecific triggering signal» not delivered by the Ig receptors.—Scand. J. Immunol., 1974, 3, p. 133—139.
- Davies A. J. S., Leuchars E., Wallis V., Koller P. C. Thymus-derived cell participation in an immune response.—1-st Intern. Congr. Transplant. Soc. (abstr.). Paris, June 26—30, 1967, p. 94.
- Diener E., Shortman K., Russel P. Induction of immunity and tolerance in vitro in the absence of phagocytic cells.—Nature, 1970, 225, p. 731—732.
- Doenhoff M. J., Janossy G., Kerbel R. S. Enumeration of polyclonal mitogen-responsive cells in different lymphoid tissues of the mouse.—Immunology, 1976, 30, p. 367—378.
- Drury P. J., Singhal S. K. Isolation of θ -iso-antigen-negative antibody—inhibiting cells from normal mouse bone marrow according to their density and surface adherent properties.—Intern. Arch. Allergy, 1974, 46, p. 707—724.
- Dutton R. W. Separate signals for the initiation of proliferation and differentiation in the B cell response to antigen.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 66—77.
- Duwe A. K., Singhal S. K. Suppression by soluble factor released from B cells.—Adv. Exptl Med. Biol., 1976, 66, p. 607—615.

- Dyminski J. W., Smith R. T.** Immunologic activities of thymus cell subpopulations.—*Serol. Haematol.*, 1974, 7, p. 524—547.
- Feldbush T. L.** Inhibition of adoptive secondary responses by lymphoid cell populations.—*Cell. Immunol.*, 1976, 24, p. 132—145.
- Feldmann M.** Cell interaction in the immune response in vitro. V. Specific collaboration via complexes of antigen and thymus-derived cell immunoglobulin.—*J. Exptl Med.*, 1972, 134, p. 737—749.
- Feldmann M.** Induction of B cell tolerance by antigen specific T cell factor.—*Nature New Biol.*, 1973, 234, p. 62—88.
- Feldmann M. T.** Cell suppression in vitro. II. Nature of specific suppressive factor.—*Europ. J. Immunol.*, 1974, 4, p. 667—674.
- Feldmann M., Basten A.** Cell interactions in the immune response in vitro. III. Specific collaboration across a cell impermeable membrane.—*J. Exptl Med.*, 1972, 136, p. 49—67.
- Feldmann M., Beverley P. C. L., Dunkley M., Kontiainen S.** Different Ly antigen phenotypes of in vitro induced helper and suppressor cells.—*Nature*, 1975a, 258, p. 614—616.
- Feldmann M., Howard J. G., Desaymard C.** Role of antigen structure in the discrimination between tolerance and immunity by B cells.—*Transplant. Rev.*, 1975b, 23, p. 78—97.
- Feldmann M., Kontiainen S.** Suppressor cell induction in vitro. II. Cellular requirements of suppressor cell induction.—*Europ. J. Immunol.*, 1976, 6, p. 302—305.
- Feldmann M., Nossal G. J. V.** Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T cells, B cells and macrophage.—*Transplant. Rev.*, 1972, 13, p. 3—34.
- Feldmann M., Palmer J.** The requirement for macrophages in the secondary immune response to antigens of small and large size in vitro.—*Immunology*, 1971, 21, p. 685—693.
- Feldmann M., Cone R. E., Marchalonis J. J.** Cell interactions in the immune response in vitro. VI. Mediation by T cell surface monomeric IgM.—*Cell. Immunol.*, 1973, 9, p. 1—13.
- Fishman M.** Antibody formation in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1961, 114, p. 837—849.
- Friedman H. P., Stavitsky A. B., Solomon J. M.** Induction in vitro of antibodies to phage T2: antigens in the RNA extract employed.—*Science*, 1965, 149, p. 1106—1108.
- Gershon R. K.** T cell control of antibody production.—In: *Contemporary topics in immunobiology*. V. 3. M. D. Cooper, N. L. Warner (Eds.) N. Y., Plenum Publ. Corp., 1974, p. 1—40.
- Gershon R. K., Cohen P., Hencin R., Lieberhaber S. A.** Suppressor T cells.—*J. Immunol.*, 1972, 108, p. 586—590.
- Gershon R. K., Kondo K.** Infections immunological tolerance.—*Immunology*, 1971a, 21, p. 903—915.
- Gershon R. K., Kondo G.** Antigenic competition between heterologous erythrocytes. I. Thymic dependency.—*J. Immunol.*, 1971b, 106, p. 1524—1531.
- Gorczynski R. M.** Specific modulation of antibody production in vitro by soluble mediators.—*Immunology*, 1974, 26, p. 77—95.
- Ha T. Y., Waksman B. Z., Treffers H. P.** The thymic suppressor cell. II. Metabolic requirements of suppressor activity.—*Immunol. commun.*, 1974, 3(4), p. 351—359.
- Hoffman M.** Peritoneal macrophages in the immune response to SRBC in vitro.—*Immunology*, 1970, 18, p. 791—797.
- Hunig T., Shimpl A., Wecker E.** Autoradiographic studies on the proliferation of antibody-producing cells in vitro.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 754—760.
- Jacobson E. B., Herzenberg L. A., Riblet R., Herzenberg L. A.** Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis. II. Transfer of suppressing factor with spleen cells.—*J. Exptl Med.*, 1972, 135, p. 1163—1176.
- Jerne N. K., Nordin A. A.** Plaque formation in agar by single antibody producing cells.—*Science*, 1963, 140, p. 405—407.
- Jones J. M., Amsbaugh D. F., Stashak P. W. e. a.** Kinetics of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. III. Evidence that suppressor cells function by inhibiting the recruitment and proliferation of antibody-producing cells.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 647—656.
- Kasahara T., Shioiri-Nakana K.** Splenic suppressing factor: purification and characterization of a factor suppressing thymidine incorporation into activated lymphocytes.—*J. Immunol.*, 1976, 116, p. 1251—1256.
- Katz D. H.** Helper and suppressor functions of T lymphocytes.—*Progr. Immunol.*, 1974, 11, p. 77—88.
- Katz D. H.** Interactions between T and B lymphocytes in immune responses.—*J. Invest. Dermatol.*, 1975, 65, p. 347—352.
- Katz D. H., Hamaoka T., Benacerraf B.** Immunological tolerance in bone marrow-derived lymphocytes. III. Tolerance induction in primed B cells by hapten conjugates of unrelated immunogenic or «nonimmunogenic» carriers.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 1464—1476.

- Katz S. I., Parker D., Sommer G., Turk J. L. Suppressor cells in normal immunization as a basic homeostatic phenomenon.—*Nature*, 1974, 248, p. 612—614.
- Khaitov R. M., Petrov R. V., Gamberov S. S. e. a. [Хаџров Р. М., Петров Р. В., Гамбаров С. С.]. Stem cells and T and B lymphocytes during tumour growth.—*Cell. Immunol.*, 1976, 22, p. 1—10.
- Kilshaw P. J., Brent L., Pinto M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts.—*Nature*, 1975, 255, p. 489—491.
- Klaus G. G. B., Humphrey J. H. The immunological properties of haptens coupled to thymus-independent carrier molecules. I. Characteristics of the immune response to DNP-lysine-substituted SIII and levan.—*Europ. J. Immunol.*, 1974, 4, p. 370—378.
- Klaus G. G. B., Humphrey J. H. Mechanisms of B cell triggering: studies with T cell-independent antigens.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 105—119.
- Kontinen S., Feldmann M. Suppressor cell induction in vitro. I. Kinetics of induction of antigen-specific suppressor cells.—*Europ. J. Immunol.*, 1976, 6, p. 296—304.
- Lawrence D. A., Weigle W. O. Stimulation of antibody production to the hapten, 2,4-dinitrobenzene by affinity-labelled murine lymphoid cells. II. Suppressive activity of an excess of thymocytes.—*Cell. Immunol.*, 1976, 23, p. 117—125.
- McCullagh P. J. The abrogation of sheep erythrocyte tolerance in rats by means of the transfer of allogeneic lymphocytes.—*J. Exptl Med.*, 1970, 132, p. 916—925.
- McGregor D. D., McCullagh P. J., Gowans J. L. The role of lymphocytes in antibody formation. I. Restoration of the haemolysin response in X-irradiated rats with lymphocytes from normal and immunologically tolerant donors.—*Proc. Roy. Soc.*, 1967, B168, p. 229—243.
- Mikhailova A. A., Madar I., Hraba T. The study of antibody producing cell numbers in mixed cultures of syngeneic lymphoid cells from immune and intact donors.—*Folia biol.*, 1973, 19, p. 315—320.
- Mikhailova A. A., Petrov R. V., Zakharova L. A. [Мухоморова А. А., Петров Р. В., Захарова Л. А.]. Immunoglobulin synthesis in mixed cultures of syngeneic cells of different lymphoid tissues.—*J. Immunol.*, 1971, 106, p. 1086—1088.
- Miller H. C., Cudkovic G. Antigen-specific cells in mouse bone marrow. I. Lasting effects of priming in immunocyte production by transferred marrow.—*J. Exptl Med.*, 1970, 132, p. 1122—1132.
- Müller J. F. A. P., Mitchell G. F. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes.—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 801—820.
- Mitchell G. F., Lafleur L., Andersson K. Evidence for readily induced tolerance to heterologous erythrocytes in nude mice.—*Scand. J. Immunol.*, 1974, 3, p. 39—43.
- Möller G. One non-specific signal triggers B lymphocytes.—*Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 126—137.
- Mosier D. E. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro.—*Science*, 1967, 158, p. 1573—1575.
- Mosier D. E., Johnson B. M., Paul W. E., McMaster P. R. B. Cellular requirements for the primary in vitro antibody response to DNP-Ficoll.—*J. Exptl Med.*, 1974, 139, p. 1354—1361.
- Munro A., Hunter P. In vitro reconstitution of the immune response of thymus deprived mice to sheep red blood cells.—*Nature*, 1970, 225, p. 277—278.
- Nakano K., Muramatsu S. Studies on the role of macrophages in the antibody response of mice: stimulation of T cell dependent antibody responses by tolerogenic soluble antigen trapped by macrophages.—*J. Reticuloendothel. Soc.*, 1976, 19, p. 347—360.
- Naor D., Salton R., Falkenberg F. Lack of requirement for efficient antibody formation to trinitrophenylated mouse red cells in mice: role for thymocytes in suppression of the immune response.—*Europ. J. Immunol.*, 1975, 5, p. 220—223.
- Nossal G. J. V., Cunningham A., Mitchell G. F., Miller J. F. A. P. Cell to cell interaction in the immune response. III. Chromosomal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice.—*J. Exptl Med.*, 1968, 128, p. 839—846.
- Okumura K., Tada T. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. IX. Further characterization of the antigen-specific inhibitory T cell factor in hapten-specific homocytotropic antibody response.—*J. Immunol.*, 1974, 112, p. 783—791.
- Parkhouse R. U. E., Dutton R. W. Inhibition of spleen cells DNA synthesis autologous macrophages.—*J. Immunol.*, 1966, 97, p. 663—669.
- Petrov R. V., Khaitov R. M. [Петров Р. В., Хаџров Р. М.]. B-cell suppression of antibody response to sheep red blood cells in mice of high and low-responding genotypes.—*Cell. Immunol.*, 1977, 28, p. 298—306.
- Petrov R. V., Mikhailova A. A. [Петров Р. В., Мухоморова А. А.]. Cell interaction in the immune response: collaboration at the level of mature antibody produ-

- cers.—Cell. Immunol., 1972, 5, p. 392—401.
- Petrov R. V., Mikhailova A. A., Stepanenko P. N., Zakharova L. A. [Петров Р. В., Михайлова А. А., Степаненко П. Н., Захарова Л. А.]. Cell interactions in the immune response: effect of humoral factor released from bone marrow cells on the quantity of mature antibody producers in culture of immune lymph node cells.—Cell. Immunol., 1975, 17, p. 342—350.
- Petrov R. V., Soslavina L. S., Panteleev E. I. [Петров Р. В., Сославина Л. С., Пантелеев Е. И.]. Stem-cell inactivation mixed spleen cell cultures.—Nature, 1968, 217, p. 558—560.
- Phanuphak P., Moorhead J. W., Claman H. N. Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. IV. Transfer of tolerance with suppressor T cells.—J. Immunol., 1974, 113, p. 548—573.
- Pick H., Turk J. L. The biological activities of soluble lymphocyte products.—Clin. Exptl Immunol., 1972, 10, p. 1—23.
- Playfair J. H. L. The role of antibody in T cell responses.—Clin. Exptl Immunol., 1974, 17, p. 1—18.
- Rich R. R., Rich S. S. Suppression of mixed lymphocyte reactions by alloantigen activated spleen-localizing thymocytes.—Cell. Immunol., 1976, 22, p. 358—368.
- Roitt J. M., Greaves M. F., Torrigiani G., Brostoff J., Playfair J. H. L. The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views.—Lancet, 1969, 2, p. 367—369.
- Roseman J. H. X-ray resistant cell required for the induction of in vitro antibody formation.—Science, 1969, 165, p. 1125—1128.
- Rotter V., Trainin N. Thymus cell population exerting a regulatory function in the immune response of mice to polyvinyl pyrrolidone.—Cell. Immunol., 1974, 13, p. 76—86.
- Rubin A. S., Coons A. H. Specific heterologous enhancement of immune responses. III. Partial characterization of supernatant material with enhancing activity.—J. Immunol., 1972, 108, p. 1597—1604.
- Rubin A. S., MacDonald A. B., Coons A. H. Specific heterologous enhancement of immune responses. V. Isolation of soluble enhancing factor from supernatants of specifically stimulated and allogeneically lymphoid cells.—J. Immunol., 1973, 111, p. 1314—1318.
- Sacks D. H., Dickler H. B. The possible role of I region determined cell surface molecules in the regulation of immune responses.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 159—175.
- Schrader J. W. The mechanism of bone marrow-derived (B) lymphocytes activation. II. A «second signal» for antigen-specific activation provided by flagellin and lypopolysaccharide.—Europ. J. Immunol., 1974, 4, p. 20—24.
- Schimpl A. Regulation einer in vitro humoralen Immunreaktion durch ein lösliches T-Zellprodukt.—Berl. Phys.-Med. Ges. Würzburg, 1975, 83, S. 71—78.
- Schimpl A., Wecker E. Replacement of T cell function by a T cell product.—Nature New Biol., 1972, 237, p. 15—17.
- Schimpl A., Wecker E. A third signal in B cell activation given by TRF.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 176—188.
- Sela M., Mozes E. The role antigenic structure in B lymphocyte activation.—Transplant. Rev., 1975, 23, p. 189—201.
- Shearer G. M., Weinstein Y., Melmon K. L. Enhancement of immune response potential of mouse lymphoid cells fractionated over insolubilized conjugated histamine columns.—J. Immunol., 1974, 113, p. 597—607.
- Shou L., Schwartz S. A., Good R. A. Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors.—J. Exptl Med., 1976, 143, p. 110—1110.
- Singhal S. K., King S., Drury P. J. Antibody-inhibiting activity of bone marrow cells in vitro.—Intern. Arch. Allergy, 1972, 43, p. 434—439.
- Sjöberg O. Rapid breaking of tolerance against Escherichia coli lipopolysaccharide in vivo and in vitro.—J. Exptl Med., 1972, 135, p. 850—859.
- Tada T., Okumura K., Taniguchi M. Regulation of homocytotropic antibody formation in the rats. VIII. An antigen specific T cell factor that regulates anti-hapten homocytotropic antibody response.—J. Immunol., 1973, 111, p. 952—961.
- Tadakuma T., Kühner A. L., Rich R. R. et al. Biological expressions of lymphocyte activation. V. Characterization of a soluble immune response suppressor (SIRS) produced by concanavalin A-activated spleen cells.—J. Immunol., 1976, 117, p. 323—330.
- Taniguchi M., Hayakawa K., Tada T. Properties of antigen-specific suppressive T cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. II. In vitro activity and evidence for the I region gene product.—J. Immunol., 1976, 116, p. 542—548.
- Taussig M. J. T cell factor which can replace T cells in vivo.—Nature, 1974a, 248, p. 234—236.
- Taussig M. J. Demonstrating of suppressor T cells in a population of «educated» T cells.—Nature, 1974b, 248, p. 236—238.
- Taussig M. J., Munro A. J. Removal of specific cooperative T cell factor by anti-

- H-2 but not anti-Ig sera.— *Nature*, 1974, 251, p. 63—65.
- Taussig M. J., Munro A. J., Campbell A. J. e. a. Antigen specific T cell factor in cell cooperation. Mapping within the I region of the H-2 complex and ability to cooperate across allogeneic barriers.— *J. Exptl Med.*, 1975, 142, p. 694—712.
- Taylor R. B., Basten A. Suppressor cells in humoral immunity and tolerance.— *Brit. Med. Bull.*, 1976, 32, p. 152—157.
- Thomas D. W., Roberts W. K., Tolmache D. W. Regulation of the immune response: production of a soluble suppressor by immune spleen cells in vitro.— *J. Immunol.*, 1975, 114, p. 1616—1622.
- Trenkner E. The use of allogeneic T lymphocytes and bacterial lipopolysaccharide to induce immune responses to monovalent haptens in vitro.— *J. Immunol.*, 1974, 113, p. 918—924.
- Unanue E. R., Calderon J. Evaluation of the role of macrophages in immune induction.— *Federat. Proc.*, 1975, 34, p. 1737—1742.
- Waksman B. H., Hamba J. On soluble mediators of immunological regulation.— *Cell. Immunol.*, 1976, 21, p. 161—176.
- Waldman S. R., Gottlieb A. A. Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells: effects of soluble factor from macrophages.— *Cell. Immunol.*, 1973, 9, p. 142—156.
- Waldmann H., Munro A. J. T cell dependence of B cell unresponsiveness in vitro.— *Europ. J. Immunol.*, 1974, 4, p. 410—416.
- Waldmann H., Poulton P., Desaymard C. Antigen non-specific T cell factor in B cell activation. Origin, biological properties and failure to show a relationship to H-2.— *Immunology*, 1976, 30, p. 723—733.
- Waldron J. A., Horn R. G., Rosenthal A. S. Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: functional aspects of antigen handling by macrophages.— *J. Immunol.*, 1974, 112, p. 746—749.
- Walker W. S. Separate Fc-receptors for immunoglobulins IgG 2a and IgG 2b on an established cell line of mouse macrophages.— *J. Immunol.*, 1976, 116, p. 911—914.
- Watson J. Cyclic nucleotides as intracellular mediators of B cell activation.— *Transplant. Rev.*, 1975, 23, p. 223—249.
- Watson J., Epstein R., Cohn M. Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen-sensitive cells.— *Nature*, 1973, 246, p. 405—406.
- Wu C. Y., Lance E. M. Immunoregulation by spleen-seeking thymocytes. II. Role in the response to sheep erythrocytes.— *Cell. Immunol.*, 1974, 13, p. 1—11.
- Zan-Bar I., Nachtigal D., Feldmann M. Mechanisms in immune tolerance. I. A specific block of immunological memory in HSA-tolerant mice.— *Cell. Immunol.*, 1974, 10, p. 19—30.
- Zembala M., Asherson G. L. Depression of the T cell phenomenon of contact sensitivity by T cells from unresponsive mice.— *Nature*, 1973, 244, p. 227—228.

VIII

ИММУНОГЕНЕТИКА ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГЕНОВ ТКАНЕВОЙ СОВМЕСТИМОСТИ

Главный комплекс генов тканевой совместимости (в дальнейшем — главный комплекс) контролирует сильные трансплантационные антигены, а также другие признаки, которые мы рассмотрим ниже. Этот комплекс состоит из нескольких тесно сцепленных локусов с множественными аллелями, вследствие чего вся система антигенов, которые он контролирует, чрезвычайно полиморфна. Похожие друг на друга, гомологичные главные комплексы обнаружены у всех исследованных видов млекопитающих и человека (Götze, 1977). Хорошо изучен главный комплекс мыши, который называется H-2, и человека, известный как HLA, а информация о главных комплексах у остальных видов относительно скудна. Эта область исследований очень быстро развивается. За последние годы опубликовано несколько обзорных работ и монографий (Ивани, Егоров, 1975; Klein, 1975; Snell e. a., 1976; Егоров, 1977), сделавших ее достижения достоянием широких кругов биологов и медиков. Поэтому в настоящем обзоре приведены главным образом новые сведения, не вошедшие в упомянутые сводки.

Генетические карты комплекса H-2 мыши и комплекса HLA человека очень похожи и представляют собой короткие участки хромосомы (17-й у мыши и 6-й у человека) длиной 0,5—1,5 морганиды, несущие сходные наборы генетических локусов. Комплексы H-2 и HLA подразделяются на несколько генетических областей и субобластей.

Набор аллелей всех генов главного комплекса в одной хромосоме называется гаплотипом. У каждого вида два локуса контролируют серологически определяемые антигены лимфоцитов. Это «классические» локусы H-2K и H-2D у мыши и HLA-A (старое название LA) и HLA-B (старое название FOUR) у человека. Как у мыши, так и у человека недавно открыт третий локус: соответственно H-2G и HLA-C (старое название AJ). Различают так называемые частные и общие серологически определяемые специфичности (антигены). Частные антигены встречаются только в одном гаплотипе H-2 и в производных от него рекомбинантах; общие специфичности отражают перекрестную реактивность между несколькими частными.

Вероятно, несколько локусов контролируют антигены, выявляемые в реакциях клеточного иммунитета. К этим реакциям относятся реакции в смешанной культуре лимфоцитов (РСКЛ) и реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). У мыши эти локусы называются *Lad*, у человека — HLA-D (старое название MLC). Возможно, однако, что РСКЛ и РТПХ выявляют несколько различные антигены. До сих пор дискутируется вопрос, какие антигены главного комплекса обнаруживает цитотоксическая реакция иммунных лимфоцитов. Неясно, идентичны ли эти антигены серологически определяемым антигенам либо они представляют собой самостоятельные молекулы на клеточной поверхности, генетические детерминанты которых тесно сцеплены с генами серологически

Генетическая карта комплекса H-2 — T1a мыши

Области	K		I				
			I-A	I-B	I-J	I-E	I-C
Субобласти							
Локусы	H-33	H-2K	Ir-1A	Ir-1B	Ia-4	Ia-5	Ia-3
Влияние на							
гуморальный иммунный ответ		K	I-A	I-B	I-J	I-E	I-C
взаимодействие клеток		K	I-A	I-B	I-J	I-E	
хелперную функцию			I-A				
супрессорные факторы					I-J		
ограничение по H-2		K					
активность комплемента							

Генетическая карта комплекса HLA человека

Локусы	D, Ia	B	C	A
Влияние на резистентность к болезням				

определимых антигенов. С главным комплексом мыши и человека сцеплены локусы иммунного ответа (Ir), а также локусы, контролирующие синтез некоторых компонентов гемолитического комплемента. Если серологически определяемые антигены представлены на всех лимфоцитах и содержатся почти во всех тканях, то антигены Ia присутствуют в больших количествах только на лимфоцитах B и отсутствуют на лимфоцитах T. Соответствующие генетические детерминанты локализованы в области I комплекса H-2 мыши, а у человека эти локусы пока точно не картированы.

Главный комплекс представлен большим числом альтернативных форм, или гаплотипов. У гибридных мышей обнаружено не менее 24 различных гаплотипов H-2 (Demant, 1973; Klein, 1975), а у диких мышей того же вида *Mus musculus* гаплотипов H-2 очень много, их точное число пока трудно определить. Число возможных гаплотипов HLA достигает нескольких тысяч, хотя эта система, вероятно, менее полиморфна, чем H-2.

Серологически определяемые антигенные продукты локусов H-2 и HLA представляют собой гликопротеиды, свободно плавающие на клеточной мембране, в которую они погружены своей гидрофобной частью (Snell et al., 1976). Они состоят из двух полипептидов, один из которых (м. в. 45 000) ответствен за антигенную активность всей молекулы. С этим полипептидом соединена полисахаридная цепь (м. в. 3300), вероятно, не влияющая на антигенные свойства. Другой полипептид (м. в. 11 600) идентичен β_2 -микроглобулину и соединен с первым нековалентной связью. По-видимому, на поверхности клетки эти молекулы представляют собой тетрамеры, состоящие из двух цепей каждого типа. Антигены Ia изучены меньше, их молекулярный вес около 30 000, они не соединены с β_2 -микроглобулином. На клеточной поверхности они перераспределяются независимо от H-2K и H-2D.

S		G		D		T				
Ss-Slp	H-2G	H-2D	H-2L	Qa-1	H-31	Qa-2	Qa-3	H-32	Tla	
<u>S</u>		<u>D</u>								

Недавно получены данные о первичной структуре молекул серологически определяемых антигенов: H-2 (Capra e. a., 1976; Ewenstein e. a., 1976; Henning e. a., 1976; Silver, Hood, 1976) и HLA (Terhorst e. a., 1976). Гомология между молекулами H-2 и HLA составляет 44—67%, если судить по определенной к настоящему времени последовательности примерно 30 аминокислотных остатков NH₂-конца молекулы. Гомология между молекулами H-2K и H-2D очень высока и составляет 63—85%. С другой стороны, различия между природными аллельными формами гена H-2K (а также H-2D) составляют 29—38%, в то время как в системе HLA — только 10%. Следовательно, встречающиеся в природе аллели этих генов являются результатом не одного, а нескольких последовательных мутационных событий, что сильно затрудняет их функциональный анализ.

Таким образом, в настоящее время имеются данные о тонкой генетической структуре главного комплекса, а также результаты биохимических исследований некоторых антигенов этого комплекса; известно также, что данный комплекс контролирует разнообразные признаки, перечисленные выше.

Главный комплекс генов тканевой совместимости — одна из наиболее изученных генетических систем у млекопитающих. Но, как это ни странно, неизвестно, какова же его первичная биологическая функция, поскольку ни один из упомянутых признаков не может рассматриваться в качестве таковой. Нет недостатка в умозрительных гипотезах, объясняющих функцию этого комплекса, но пока очень мало экспериментальных данных, приближающих нас к конкретному решению проблемы. Точки зрения разных авторов часто диаметрально противоположны. Так, в свое время был выдвинут ставший популярным аргумент, что трансплантационные антигены существуют не для того, чтобы усложнять жизнь хирургам-трансплантологам, и поэтому несовместимость тканей не может быть естественной функцией этих антигенов (Thomas, 1959). Но недавно Клейн (Klein, 1977) подверг сомнению это предположение. Он заметил, что многие беспозвоночные животные ведут малоподвижный образ жизни при большой скученности особей, вследствие чего возникает опасность потери индивидуальности путем слияния тканей разных особей. Клейн предположил, что у беспозвоночных животных есть генетический механизм, функция которого — защита индивидуаль-

ности отдельных особей (здесь он ссылается на: Burnet, 1970), и что это и есть система тканевой совместимости. Позвоночные животные более подвижны, и им не грозит потеря индивидуальности. Но обычно они живут дольше беспозвоночных, вследствие чего у них повышен риск появления уклоняющихся вариантов соматических клеток, способных к неконтролируемому росту и поэтому опасных для организма. Следовательно, позвоночным животным нужна специальная система надзора, способная распознавать и элиминировать измененные клетки. Для этого более всего подходит система тканевой совместимости, которая, как считает Клейн (Klein, 1977), у позвоночных животных переключилась на функцию надзора. Субобласти иммунного ответа, которые входят в состав главного комплекса, необходимы для защиты макроорганизма от атак патогенных микроорганизмов, как необходим для этого и гемолитический комплемент, некоторые компоненты которого также детерминированы главным комплексом.

Таким образом, главный комплекс контролирует целый набор компонентов иммунной системы организма, очевидно, имеющих важнейшее значение для его выживания. Но почему все эти гены наследуются вместе как единый блок, или комплекс, и сохраняются в виде сходных комплексов у таких эволюционно разобщенных видов, как, например, человек, мышь, курица и шпорцевая лягушка? Различные мнения по этой проблеме представлены в ряде публикаций (Silver, Hood, 1976; Егоров, 1977; Götte, 1977). Мы рассмотрим некоторые пути экспериментального решения вопроса о функции главного комплекса и его месте в системе иммунитета. Речь в основном пойдет о генах, контролирующих серологически определяемые антигены мыши, H-2K и H-2D.

Поскольку главный комплекс — это комплекс многих генов, которые могут контролировать разные, хотя и сходные, функции, то необходимо вычленив влияние каждого гена. Другими словами, нужно создать пару коизогенных линий, которые различались бы не по всему главному комплексу или даже отдельной его области, а только по одному гену, например H-2D. Тогда можно будет анализировать действие этого гена, участие его продукта в иммунологических реакциях. Достигнуть такой изогенности путем генетической рекомбинации практически невозможно, поскольку нет способа показать, что кроссинговер прошел на границе между двумя генами и отделил именно тот из них, который нам нужен. Кроме того, как уже упоминалось, встречающиеся в природе аллели одного гена (например, H-2D) могут различаться по нескольким аминокислотным заменам. Следовательно, эти аллельные различия нельзя приписать одному мутационному событию, наоборот, они — конечный результат нескольких последовательных мутаций. Вполне возможно, что некоторые из этих мутаций могли оказывать противоположные влияния на свойства и функцию конечного продукта этого гена и подвергались действию естественного отбора. Поэтому для изучения функции продукта гена, контролирующего серологически определяемый антиген, лучше всего использовать мутантные по комплексу H-2 линии мышей, которые удовлетворяют всем изложенным здесь требованиям (Егоров, 1974; McKenzie e. a., 1977a).

Для обнаружения мутантных по H-2-комплексу мышей специальными методами ищут мутантов среди большого числа нормальных мышей. До сих пор поиски проводили только одним методом: путем массовых пересадок кожи мышей одной инбредной линии (Егоров, Блан-

дова, 1968) или гибридов F₁ между двумя гибридными (Bailey, Kohn, 1965) или когенными линиями (Егоров, 1967). Согласно генетическим законам трансплантации, в норме все такие трансплантаты должны приживаться; отторжение трансплантатов свидетельствует о носительстве мутации тканевой совместимости (Н-мутации) донором или реципиентом. После обнаружения Н-мутации ее переводят в гомозиготное состояние и определяют ее принадлежность к Н-2. Если используются гибриды F₁ двух разных гибридных линий, то мутацию необходимо перевести на когенную основу одной из линий путем повторных возвратных скрещиваний, на что уходит несколько лет работы. Только после этого можно установить локус, в котором произошла мутация. Так, мутант H₂I был выделен в 1965 г. (Bailey, Kohn, 1965), но только в 1971 г. (Bailey *et al.*, 1971) было показано, что это — мутация гена, входящего в комплекс Н-2. В настоящее время обнаружено около 20 мутантов по Н-2. Полученные генетические и биохимические данные показывают, что мутантные гаплотипы Н-2 отличаются от исходных очень небольшим участком генетического материала, скорее всего, в пределах одного цистрона (Егоров, 1974; Klein, 1977; Nathenson *et al.*, 1977).

В настоящее время различают два типа мутаций Н-2 по их фенотипическому проявлению, т. е. по иммунологическим феноменам, которые с ними ассоциированы (McKenzie *et al.*, 1977a, b). Мутации типа I вызывают отторжение трансплантатов кожи и другие реакции клеточного иммунитета в сочетании мутант↔исходная линия. Однако эти мутации не вызывают серологически определенных изменений антигенов Н-2, а точнее, эти изменения трудноуловимы. К этому типу относятся пять хорошо изученных мутаций гаплотипа Н-2^b линии C57BL/6: Н-2^{ba}, Н-2^{bs1}, Н-2^{bs2}, Н-2^{bs3}, Н-2^{bs4} (McKenzie *et al.*, 1977a). Генетические комплементационные тесты показали, что все они принадлежат к одному и тому же локусу. Весьма вероятно, что этот локус идентичен Н-2K, хотя Кohn и его группа обозначают его как z1 по названию мутации Н(z1) (Н-2^{zm}), которая была первой исследована в этой серии. Недавно описаны еще четыре мутации локуса z1 гаплотипа Н-2^b (Melvold, Kohn, 1976), которые, вероятно, также принадлежат к типу I, хотя до сих пор они исследованы только методом трансплантации кожи. Это мутанты Н-2^{bs5}, Н-2^{bs6}, Н-2^{bs7}, Н-2^{bs8}. Интересно, что три спонтанных и независимых мутанта — Н-2^{bs1}, Н-2^{bs2}, Н-2^{bs3} — фенотипически неразличимы в опытах с трансплантацией кожи. Первые два неразличимы также и в реакциях РТПХ и РСКЛ (Melief *et al.*, 1975; Melvold, Kohn, 1976). К типу I принадлежит также мутация Н-2^{ba} (M523), локализованная в области К и происходящая от гаплотипа Н-2^k линии мышей CBA/Sto (Blandova *et al.*, 1975).

Мутации типа II фенотипически проявляются во всех тех же иммунологических феноменах, что и мутации типа I. В дополнение к этому они отличаются от исходной линии еще и по серологически определенным антигенам, причем иммунизация в комбинации мутант↔исходная линия приводит к образованию циркулирующих антител соответствующей специфичности. Два таких мутанта изучены подробно: B10.D2(M504), или Н-2^{da} (Егоров, 1967; Ведерников, Егоров, 1973; Дышкант и др., 1973; Forman, Klein, 1975), и BALB/c-Н-2^{ab} (McKenzie *et al.*, 1977b). Эти мутанты некомплементарны и возникли в одном и том же генетическом локусе z2 в области D гаплотипа Н-2^a. Локус z2, по всей вероятности,

идентичен H-2D (Egorov, 1974). Третья мутация типа II, которую несет линия A.CA (M506), или H-2^a, локализована в области K гаплотипа H-2^f (Egorov, Blandova, 1972; Egorov, 1974; Klein e. a., 1976).

Следует отметить, что разделение мутации H-2 на два типа в зависимости от связанных с ними изменений серологически определяемых антигенов носит субъективный характер. Дело в том, что у мутантов типа II изменения серологически определяемых антигенов обнаружить относительно просто, тогда как у мутантов типа I — методически сложно. Такие различия между мутантом H-2^{ba} и исходной линией C57BL/6 не были обнаружены в трех лабораториях (Bailey e. a., 1971; Berke, Amos, 1973; McKenzie e. a., 1976). Кроме того, были обнаружены количественные различия в абсорбционной способности лимфоцитов этих мышей, а также другого мутанта H-2^{bd} в реакциях с антителами против H-2.33 (Apt e. a., 1975); наконец, недавно удалось обнаружить и качественные различия между мутантом и исходной линией (Мнацаканян и др., 1977; David e. a., 1977). Напомним, что для разработки методики и детального изучения изменений серологически определяемых антигенов у мутанта H-2^{da} (тип II) также потребовалось много лет (Egorov, 1967; Дишкант и др., 1973). Проблема эта до сих пор окончательно не решена, и среди исследователей нет единого мнения относительно интерпретации имеющихся данных.

Тем не менее использование мутаций H-2 позволило совершенно по-новому подойти к решению проблемы соотношения между аллоантигенами (H-2) клеточной мембраны, которые определяются серологически (при помощи антител), и теми, которые могут активировать клетки Т. Активность последних выявляется в реакциях отторжения трансплантатов, а также в других реакциях клеточного иммунитета. До недавнего времени казалось, что те же самые антигены (специфичности) H-2 выявляются как антителами, так и в реакциях клеточного иммунитета, поскольку обычно отторжение трансплантата сопровождается образованием гуморальных антител. Углубленный генетический анализ комплекса H-2 с применением мутантов и усовершенствование иммунологических методик вызвали сомнения в правильности этого положения трансплантационной иммунологии (Bach e. a., 1972, 1976; Egorov, 1974). Теперь известно, что отторжение трансплантатов по «сильному» типу в случае несовместимости по мутациям типа I (а также другие «сильные» реакции клеточного иммунитета) не связано с образованием антител, хотя небольшие изменения серологически определяемых антигенов у мутантов все же обнаруживаются. Следовательно, специфичность рецепторов клеток Т и В, распознающих трансплантационные антигены, не идентична.

Поскольку считалось, что мутации типа I не вызывают изменений серологически определяемых антигенов, их интенсивно использовали для изучения специфичности РСКЛ и цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов. Исследование перекрестной реактивности мутантов этого типа и их гибридов F₁ позволило выделить 19 специфичностей при цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов (Forman, Klein, 1975; Melief e. a., 1975, 1977). В серологических опытах никакой перекрестной реактивности мутантных антигенов пока не выявлено. Из приведенных данных следует, что аллоантигены, активирующие клетки Т и являющиеся мишенями в цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов, по специфичности не идентичны серологически определяемым антигенам.

Эти опыты обнаруживают широчайший полиморфизм антигенов-мишеней, распознаваемых цитотоксическими клетками. Перекрестная реактивность мутантных антигенов была продемонстрирована также *in vivo* (Apt e. a., 1975): мыши H-2^b и H-2^{bm}, сенсibilизированные инъекцией клеток H-2^{bm}, были способны отторгать по ускоренному типу соответственно трансплантаты кожи H-2^{bm} и H-2^b. Параллелизм результатов, полученных *in vivo* (Apt e. a., 1975) и *in vitro* (Melief e. a., 1977) имеет большое значение для трансплантологии, и в настоящее время на этой основе предпринимаются настойчивые попытки разработать более надежные тесты *in vitro*, которые позволили бы предсказывать судьбу трансплантатов тканей и органов человека.

Наиболее приемлемое объяснение феноменов, ассоциированных с мутациями H-2, основывается на аналогиях с моделью, согласно которой одна часть антигенной молекулы может функционировать как детерминанта носителя и активировать клетки Т, а другая — как гаптен и вызывать ответ клеток В, а также связывать молекулы иммуноглобулина. Была предложена гипотеза (Egorov, 1974; Ивани, Егоров, 1975), что мутации типа I, например H-2^{bm}, H-2^{bm}, затрагивают детерминанту носителя молекулы H-2, но не затрагивают гаптенные детерминанты. Наблюдаемые слабые изменения серологически определяемых детерминант в мутантах типа I можно объяснить вторичными влияниями, оказываемыми на них детерминантой носителя. На этой же основе пытаются объяснить (McKenzie e. a., 1977a) и результаты изучения клеток, модифицированных вирусом, а также химически, путем присоединения гаптена тринитрофенола (ТНФ) (Rehn e. a., 1976).

В некоторых случаях специфичность рецепторов клеток Т и В может быть очень сходной или идентичной (Rajewsky, Pohlitz, 1971; Ramseier, Lindemann, 1972). Вероятно, именно последняя модель больше подходит для объяснения изменений, наблюдаемых у мутантов типа II в отношении серологически определяемых антигенов и реакций клеточного иммунитета (Egorov, 1974). С помощью мутантов типа II исследуют взаимоотношения между частными и общими серологически определяемыми специфичностями, а также с антигенами реакций клеточного иммунитета (Egorov, 1974; McKenzie e. a., 1977a).

Известно, что для запуска дифференцировки клеток В в направлении производства антител необходима помощь клеток Т. Генетические исследования, проведенные в двух лабораториях, показывают, что такая кооперация клеток Т и В осуществляется только в случае их идентичности по области I, в то время как аллели областей К и D не имеют значения для этого феномена (Kindred, Shreffler, 1972; Katz e. a., 1975). В других лабораториях не подтвердили это наблюдение. Тем не менее область I, по-видимому, все-таки контролирует кооперацию клеток Т и В в иммунном ответе, поскольку в ней локализованы соответствующие специфические гены I γ (Katz, Benacerraf, 1975). Однако механизм действия этих генов пока точно не установлен.

Недавно были сделаны три открытия, которые, по-видимому, имеют отношение к проблеме функции главного комплекса. Первое из них состоит в том, что у мыши, инфицированной вирусом лимфоцитарного хориоменингита, образуются эффекторные лимфоциты Т, которые способны убивать как *in vivo*, так и *in vitro* клетки-мишени, инфицированные этим вирусом (Zinknagel, Doherty, 1974; Doherty e. a., 1976a, b). Но этот феномен зависит от комплекса H-2: он осуществляется только

в том случае, если эффекторные клетки и клетки-мишени несут одинаковые аллели по меньшей мере одного из локусов H-2K или H-2D. Влияние на этот эффект других областей H-2 или локусов не-H-2 не обнаружено. Сходные данные были получены также в опытах с вирусом экстремелии (ДНК-содержащим) и многими другими вирусами. Следовательно, этот феномен имеет всеобщий характер. Он назван «ограничение по H-2». Эксперименты с мутантными по H-2 мышами (Doherty *et al.*, 1976a; Kees, Blanden, 1976; Zinkernagel, 1976; McKenzie *et al.*, 1977a) показали, что антиген, который модифицируется вирусом, и антиген H-2K кодируются одним и тем же цистроном. Но та часть молекулы, которая модифицируется, не является серологически определяемой антигенной детерминантой, а представляет собой детерминанту носителя.

Второе открытие было сделано Ширером и его коллегами (Shearer, 1974; Forman, 1975; Shearer *et al.*, 1975). Эти авторы конъюгировали белки клеток селезенки мышей с ТНФ или другим гаптенем, после чего культивировали эти клетки совместно с сингенными клетками Т. Последние приобретали способность лизировать модифицированные присоединением ТНФ клетки-мишени. И опять лизис наблюдали только в том случае, если сенсibilизированные лимфоциты и клетки-мишени несли одинаковые аллели в локусах H-2K или H-2D. Этот феномен был воспроизведен также на клетках человека и оказался зависимым от антигенов HLA-A и HLA-B. Однако механизм цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов против модифицированных ТНФ клеток не во всех деталях совпадает с предыдущим, поскольку мутации H-2 не влияют на эту реакцию (Forman, Klein, 1977). По-видимому, модификация ТНФ подвергается не антиген H-2K, а антиген другого, тесно сцепленного с ним локуса.

Третье открытие принадлежит Бивену (Bevan, 1975), и Гордону с сотрудниками (Gordon *et al.*, 1975), которые установили, что лимфоциты Т, сенсibilизированные *in vitro* против определенного слабого антигена Н (не-H-2), могут лизировать клетки, несущие этот антиген, но только в том случае, если аллели локусов H-2K или H-2D одинаковы у всех трех клеток: сенсibilизирующей, эффекторной и мишени.

Таким образом, антиген, активизирующий клетки Т, обязательно должен быть представлен не в свободном виде, а на поверхности клетки: макрофага, эпителиальной клетки и др. (Basten *et al.*, 1975). По данным упомянутых выше исследователей, реактивность против такого антигена ограничена совместимостью по комплексу H-2, точнее, некоторым областям этого комплекса.

Для объяснения всех этих результатов, основной механизм которых, очевидно, одинаков (ограничение по H-2), было предложено несколько гипотез (Blanden *et al.*, 1976; Doherty *et al.*, 1976a, b; Snell *et al.*, 1976). Первая из них, известная под названием модели модификации «своего», или «взаимодействующих антигенов», предполагает, что единственный рецептор лимфоцита Т распознает антиген (или антигенный комплекс), который детерминирован как геном H-2K или H-2D, так и геном вируса. Альтернативная гипотеза постулирует существование двух отдельных рецепторов клеток Т, один из которых распознает антиген H-2, а другой — вирусный антиген. Антигены локусов H-2K и H-2D распознаются двумя разными клоонами клеток Т. Обе гипотезы допускают, что распознавание «своего» осуществляется теми же генами V (в клетках Т), которые определяют и аллореакции. Таким образом, гены H-2K

и H-2D функционируют как маркеры «своего» в осуществляемых клетками иммунных реакциях против вирусов, вероятно, вирусиндуцированных опухолей и вообще против клеток с измененной поверхностью. Как отмечалось выше, это одна из наиболее важных, жизненно необходимых функций. Расшифровка механизмов, осуществляющих эту функцию, позволит рационально использовать в клинике защитные иммунные реакции, осуществляемые клетками Т.

Вопрос о том, как происходит распознавание своих антигенов H-2K и H-2D, является центральным в проблеме ограничения по H-2. И первые результаты, которые могут служить основой для его решения, также были получены на мутантах по H-2 (Егоров *е. а.*, 1977; Мнацаканян и др., 1977). В одной из мутантных по H-2К линий (H-2^{ka}) был обнаружен специфический дефект иммунного ответа в РТПХ против другого мутанта (H-2^{bd}). Этот дефект комплементируется в результате скрещивания с целым рядом инбредных линий, но не со всеми. Важно, что другие мутанты по H-2К плохо комплементируют дефект реактивности в H-2^{ka}. Следовательно, ген H-2К сам контролирует интенсивность пролиферативного ответа в реакции РТПХ против мутантного антигена того же самого гена H-2К. Дефект не проявляется при РСКЛ. Можно предположить несколько объяснений этого явления, но наиболее вероятное из них состоит в том, что продукт гена H-2К служит рецептором клеток Т, распознающим антигены тканевой совместимости. Другими словами, мы предполагаем, что антигены H-2К распознают сами себя.

Недавно получены новые данные, которые имеют отношение к этому вопросу. Залески и Клейн (Zaleski, Klein, 1977) исследовали первичный иммунный ответ мышей против антигена лимфоцитов Thy-1.1 путем подсчета числа клеток (бляшек антител), продуцирующих антитела, способные лизировать тимоциты мышей линии АКР (в присутствии комплемента). Результаты типирования рекомбинантов по H-2 этим методом позволили локализовать один из генов Ig-Thy-1 в области К комплекса H-2 и исключить его локализацию в области I. Мутант H-2K^{ka} (M523) показал слабую реакцию против этого антигена (472 бляшки), а исходная линия СВА/У — сильную (9045 бляшек). Авторы полагают, что ген Ig-Thy-1 может быть идентичен H-2К, и ставят вопрос о том, что необходимо вернуться к гипотезе об идентичности антигенраспознающего рецептора клетки Т с молекулой H-2 (Бепасергаф, McDevitt, 1972).

Напротив, исследователи феномена ограничения по H-2 в цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов против вирусомодифицированных клеток пришли к выводу, что антигены H-2 не распознают сами себя (Doherty *е. а.*, 1976b) по следующим причинам: антигены H-2 проявляются кодоминантно на поверхности как цитотоксических лимфоцитов Т, так и клеток памяти, инфицированных вирусом мышей; сыворотки против антигенов H-2 могут предотвращать лизис, если ими обрабатывать клетки-мишени, но не лимфоциты; наконец, в радиационных химерах могут образовываться цитотоксические клетки Т, специфически активные против аллогенных (т. е. отличающихся от них по H-2) вирусинфицированных клеток-мишеней.

Можно ли удовлетворительно объяснить это противоречие? Пока нет определенного ответа на поставленный вопрос, хотя возможно, что противоречие это и не существует, поскольку механизм ограничения по H-2 и реакции против мутантной специфичности H-2, по всей вероятности, разные (Егоров *е. а.*, 1977). Так, положительная пролиферативная

реакция РТПХ была отмечена в комбинации $H-2^{ba}/H-2^b \rightarrow H^{-bd}/H-2^{bd}$, отрицательная — в комбинации $H-2^{ba}/H-2^{ba} \rightarrow H-2^{ba}/H-2^{bd}$, хотя в случае проявления здесь ограничения по H-2 результат должен быть как раз обратный.

Проллиферативная РТПХ соответствует фазе распознавания антигена необлученными клетками Т, и в этом смысле она сходна с РСКЛ, в то время как феномен ограничения по H-2 проявляют эффекторные клетки (цитотоксическая реакция иммунных лимфоцитов). В случае аллореакций соответствующие два типа клеток также распознают антигены, кодируемые разными генетическими локусами (Ивани, Егоров, 1975; Bach e. a., 1976). Кроме того, механизмы цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов против клеток, модифицированных разными антигенами (гаптенами), явно различны, поскольку модификации подвергаются антигены, контролируемые разными областями комплекса H-2. Так, эта реакция против инфицированных вирусом клеток осуществляется цитотоксическими клетками, несущими маркер Ly-2 (Cantor, Boyse, 1975; Kisielow e. a., 1975), и, как мы видели, их реактивность ограничена антигенами H-2K и H-2D. Ранее уже упомянуто, что кооперация клеток-помощников, несущих маркер Ly-1, по-видимому, ограничена необходимостью их идентичности по области I-A (Katz e. a., 1975). Гиперчувствительность замедленного типа против куринного гамма-глобулина осуществляется клетками Т с маркером Ly-1 и также ограничена областью I-A, однако для той же реакции против динитрофлуоробензола достаточно совместимости клеток по одной из трех областей: K, D или I (Vadas e. a., 1977). По-видимому, выбор области H-2, по которой ограничена реакция, зависит не столько от типа и функции клеток Т, сколько от природы антигена или гаптена.

Сравнение аллореакций с реакциями против мутантных антигенов H-2K и H-2D позволяет выявить парадокс. Известно, что встречающиеся в природе аллельные антигены (условно назовем их «большими» аллелями) локусов H-2K или H-2D различаются между собой по большому числу аминокислотных замен. Если лимфоциты и стимулирующие клетки несут разные большие аллели одного локуса, например H-2K^a и H-2K^b, но идентичны по другим областям H-2, особенно области I, то РСКЛ в этом сочетании обычно слабая, а цитотоксические Т-клетки образуются с большим трудом или вовсе не образуются (Ивани, Егоров, 1975; Bach e. a., 1976). Но оказалось, что несовместимость по точковой мутации того же гена H-2K (или H-2D) приводит к сильной РСКЛ и цитотоксической реакции иммунных лимфоцитов (Егоров, 1974; Forman, Klein, 1975; Melief e. a., 1977), так же как и модификация вирусом или гаптенном антигена H-2K. Не свидетельствует ли этот факт о том, что два разных клеточных механизма (или разные клеточные рецепторы) включаются в случае реакции против аллоантигена «большого» аллеля H-2, с одной стороны, и против мутанта по H-2 либо вирусмодифицированного «своего» антигена H-2 — с другой? Несомненно, решение этих проблем стоит на повестке дня иммунологии.

Литература

- Ведерников А. А., Егоров И. К. Изучение мутаций H-2 мышей. II. Рекомбинационный анализ мутации 504.— *Генетика*, 1973, 9, с. 60—66.
- Дишкант И. П., Ведерников А. А., Егоров И. К. Изучение мутаций H-2 мышей. III. Серологический анализ мутации 504 и произошедших от нее рекомбинантных гаплотипов.— *Генетика*, 1973, 9, с. 82—90.
- Егоров И. К. Мутация локуса histocompatibility-2 у мышей.— *Генетика*, 1967, 3, с. 136—144.
- Егоров И. К. Информационный взрыв в иммуногенетике: изучение супергена MHC.— В кн.: *Новое в генетике человека*. М., «Наука», 1977.
- Егоров И. К., Бландова З. К. Генетическая однородность мышей гибридных линий питомника «Столовая». II. Опыты с трансплантацией кожи.— *Генетика*, 1968, 4, с. 63—68.
- Ивани П., Егоров И. К. Иммуногенетика совместимости тканей (HLA и H-2). М., «Наука», 1975.
- Мнацаканян Ю. А., Поспелов Л. Е., Егоров И. К. Изучение мутаций H-2. VII. Дефектность мутанта H-1 в реакциях геммагглютинации и трансплантата против хозяина.— *Генетика*, 1977, 13, с. 25—31.
- Art A. S., Blandova Z. K., Dishkant I. P. e. a. [Art A. S., Бландова З. К., Дишкант И. П. и др.]. Studies of H-2 mutations in mice. IV. A comparison of the mutants M505 and H21 by skin grafting and serological techniques.— *Immunogenetics*, 1975, 1, p. 444—451.
- Bach F. H., Bach M. L., Sondel P. M. Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation.— *Nature*, 1976, 259, p. 273—281.
- Bach F. H., Widmer M. B., Segall M. e. a. Genetic and immunological complexity of major histocompatibility regions.— *Science*, 1972, 176, p. 4038—4040.
- Bailey D. W., Kohn H. I. Inherited histocompatibility changes in progeny of irradiated and unirradiated mice.— *Genet. Res.*, 1965, 6, p. 330—340.
- Bailey D. W., Snell G. D., Cherry M. Complementation and serological analysis of an H-2 mutant.— In: *Immunogenetics of the H-2 system*. A. Lengerova, M. Vojtiskova (Eds). Basel, Karger, 1971, p. 155—162.
- Basten A., Miller J. F. A. P., Abraham R. Relationship between Fc receptors, antigen-binding sites on T and B cells and H-2 complex associated determinants.— *J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 547—560.
- Benacerraf B., McDevitt H. O. Histocompatibility linked immune response genes.— *Science*, 1972, 175, p. 273—278.
- Berke G., Amos D. B. Cytotoxic lymphocytes in the absence of detectable antibody.— *Nature New Biol.*, 1973, 242, p. 237—239.
- Bevan M. J. Interaction antigens detected by cytotoxic T cell with the major histocompatibility complex as modifier.— *Nature*, 1975, 256, p. 419—421.
- Blanden R. V., Hapel A. J., Jackson D. C. Mode of action of Ir genes and the nature of T cell receptors for antigen.— *Immunochimistry*, 1976, 13, p. 179—191.
- Blandova Z. K., Mnatsakanyan Y. A., Egorov I. K. [Бландова З. К., Мнацаканян Ю. А., Егоров И. К.]. Study of H-2 mutations in mice. VI. M523, a new K end mutant.— *Immunogenetics*, 1975, 2, p. 291—295.
- Burnet F. M. A certain symmetry: histocompatibility antigens compared with immunocyte receptors.— *Nature*, 1970, 228, p. 123—126.
- Cantor H., Boyse E. A. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen.— *J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 1376—1389.
- Capra J. D., Vitetta E. S., Klapper D. G. e. a. Structural studies on protein products of murine chromosome 17: partial amino acid sequence of an H-2K^b molecule.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 3661—3665.
- David C. S., Neely B. C., Cullen S. E. Serological analysis of H-2 mutants. I. Evidence for lack of an H-2K specificity in B6. M505 (H-2^{9d}).— *Immunogenetics*, 1977, 5, p. 143—148.
- Demant P. H-2 gene complex and its role in alloimmune reactions.— *Transplant. Rev.*, 1973, 15, p. 164—182.
- Doherty P. C., Blanden R. V., Zinkernagel R. M. Specificity of virus-immune effector T cells for H-2K or H-2D compatible interactions: implications for H gene diversity.— *Transplant. Rev.*, 1976a, 29, p. 39—124.
- Doherty P. C., Götze D., Trinchieri G., Zinkernagel R. M. Models for reconstitution of virally modified cells by immune thymus-derived lymphocytes.— *Immunogenetics*, 1976b, 3, p. 517—524.
- Egorov I. K. [Егоров И. К.]. Genetic control of H-2 alloantigens as inferred from analysis of mutations.— *Immunogenetics*, 1974, 1, p. 97—107.
- Egorov I. K., Blandova Z. K. [Егоров

- И. К., Бландова З. К.]. Histocompatibility mutations in mice: chemical induction and linkage with the H-2 locus.— *Genet. Res.*, 1972, 19, p. 133—143.
- Egorov I. K., Mnatsakanyan Y. A., Pospelov L. E. [Егоров И. К., Мнацаканян Ю. А., Поспелов Л. Е.]. Do histocompatibility antigens recognize themselves?— *Immunogenetics*, 1977, 5, p. 65—75.
- Ewenstein B. M., Freed J. H., Mole L. E., Nathenson S. G. Studies on the localization of the papain cleavage site of H-2 glycoproteins.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 915—921.
- Forman J. On the role of the H-2 histocompatibility complex in determining the specificity of cytotoxic effector cells sensitized against syngeneic trinitrophenyl-modified targets.— *J. Exptl Med.*, 1975, 142, p. 403—418.
- Forman J., Klein J. Analysis of H-2 mutants: evidence for multiple CML target specificities controlled by the H-2^b gene.— *Immunogenetics*, 1975, 1, p. 469—481.
- Forman J., Klein J. Immunogenetic analysis of H-2 mutations. VI. Crossreactivity in cell-mediated lympholysis between TNP-modified cells from H-2 mutant strains.— *Immunogenetics*, 1977, 4, p. 183—193.
- Gordon R. D., Simpson E., Saleson L. E. In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (N-Y) antigen in mice.— *J. Exptl Med.*, 1975, 192, p. 1108—1120.
- Götze D. (Ed.) Major histocompatibility complex. N. Y., Springer Verlag, 1977.
- Henning R., Milner R., Reske K. e. a. Subunit structure, cell surface orientation and partial amino acid sequences of murine histocompatibility antigens.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 118—123.
- Katz D. M., Benacerraf B. The function and interrelationship of T cell receptors, I_r genes and other histocompatibility gene products.— *Transplant. Rev.*, 1975, 22, p. 175—195.
- Katz D. H., Graves M., Dorf M. E. e. a. Cell interactions between histocompatible T and B lymphocytes. VII. Cooperative response between lymphocytes are controlled by genes in the I region of the H-2 complex.— *J. Exptl Med.*, 1975, 141, p. 263—268.
- Kees U., Blanden R. V. A single genetic element in H-2K affects mouse T cell anti-viral function in poxvirus infection.— *J. Exptl Med.*, 1976, 143, p. 450—455.
- Kindred B., Shreffler D. C. H-2 dependence of co-operation between T and B cells in vivo.— *J. Immunol.*, 1972, 109, p. 940—943.
- Kisielow P., Hirst J. A., Shiku H. e. a. Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse.— *Nature*, 1975, 253, p. 219—220.
- Klein J. Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. N. Y., Springer Verlag, 1975.
- Klein J. Evolution and function of the major histocompatibility complex: facts and speculations (Opus 100).— In: Major histocompatibility complex. N. Y., Springer Verlag, 1977.
- Klein J., Egorov I. K., Mnatsakanyan Y. A., Hauptfeld V. [Клейн Я., Егоров И. К., Мнацаканян Ю. А., Хауптфельд В.]. Immunogenetic analysis of H-2 mutations. IV. Mapping of and immune reactions to the H-2^a mutation.— *Scand. J. Immunol.*, 1976, 5, p. 521—528.
- Klein J., Hauptfeld M., Hauptfeld V. Serological distinction of mutants B6. H (z1) and B6. M505 from strain C57BL/6.— *J. Exptl Med.*, 1974, 140, p. 1127—1132.
- McKenzie I. F. C., Morgan G. M., Melvold R. W., Kohn H. I. Serological and complementation studies in four C57BL/6 H-2 mutants.— *Immunogenetics*, 1976, 3, p. 241—251.
- McKenzie I. F. C., Morgan G. M., Melvold R. W., Kohn H. I. BALB/c-H-2^{ab}: A new H-2 mutant in BALB/cKh that identifies a locus associated with D region.— *Immunogenetics*, 1977a, 4, p. 333—345.
- McKenzie I. F. C., Pang T., Blanden R. V. The use of H-2 mutants as models for the study of T cell activation.— *Immunol. Rev.*, 1977b, 35, p. 181—232.
- Melief C. J. M., Schwartz R. S., Kohn H. I., Melvold R. W. Dermal histocompatibility and in vitro lymphocyte reactions of three new H-2 mutants.— *Immunogenetics*, 1975, 2, p. 337—348.
- Melief C. J. M., Van der Meulen M. Y., Postma P. CML typing of serologically identical H-2 mutants: Distinction of 19 specificities on the cells of four mouse strains carrying z1 locus mutations and the strain of origin.— *Immunogenetics*, 1977, 5, p. 43—64.
- Melvold R. W., Kohn H. I. Histocompatibility gene mutation rates: H-2 and non-H-2.— *Mutat. Res.*, 1975, 27, p. 415—418.
- Melvold R. W., Kohn H. I. Eight new histocompatibility mutations associated with the H-2 complex.— *Immunogenetics*, 1976, 3, p. 185—191.
- Nathenson S. G., Brown J. L., Ewenstein B. M. e. a. Structural differences between parent and variant H-2K glycoproteins from mouse strains carrying H-2 gene mutations.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1977, 41, p. 343—349.
- Rajewsky K., Pohlitz H. Specificity of helper function.— In: Progress in Immunology. N. Y., Acad. Press, 1971, p. 337—354.

- Ramseier H., Lindenmann J. Similarity of cellular recognition structures for histocompatibility antigens and of combining sites of corresponding alloantibody.—*Europ. J. Immunol.*, 1972, 2, p. 109—114.
- Rhen T. G., Shearer G. M., Koren H. S., Inman J. K. Cell mediated lympholysis of N-(3-nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetyl)-alanylglycyl-modified autologous lymphocytes.—*J. Exptl Med.*, 1976, 143, p. 127—142.
- Shearer G. M. Cell-mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngeneic lymphocytes.—*Europ. J. Immunol.*, 1974, 4, p. 527—533.
- Shearer G. M., Rehn T. G., Garbarino C. A. Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex.—*J. Exptl Med.*, 1975, 142, p. 1348—1364.
- Silver J., Hood L. Structure and evolution of transplantation antigens: partial amino acid sequences of H-2K and H-2D alloantigens.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 599.
- Snell G. D., Dausset J., Nathenson S. Histocompatibility. N. Y., Acad. Press, 1976.
- Terhorst C., Parham P., Mann D., Strominger J. Structure of HLA antigens: amino acid and carbohydrate compositions and N-terminal sequences of four antigen preparations.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, 73, p. 910—914.
- Thomas L. Discussion.—In: Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. London, Cassell, 1969, p. 529—532.
- Vadas M. A., Miller J. F. A. P., Whitelaw A. M., Gamble J. R. Regulation by the H-2 gene complex of delayed type hypersensitivity.—*Immunogenetics*, 1977, 4, p. 137—153.
- Zaleski M., Klein J. Mapping the Ir-The-1 locus to the region of the H-2 complex.—*Proc. 3-rd Ir-gene workshop*, 1977, p. 125—129.
- Zinkernagel R. M., Doherty P. C. Immunological surveillance against altered self component by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis.—*Nature*, 1974, 251, p. 547—548.
- Zinkernagel R. M. H-2 compatibility requirement for virus-specific T-cell-mediated cytotoxicity. The H-2K structure involved is coded by a single cistron defined by H-2K^b mutant mice.—*J. Exptl Med.*, 1976, 143, p. 437—443.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агглютинаторы 42
 Адгезивные способности клеток 165, 166, 168, 171
 Аденилциклаза 141
 Адьюванты 128
 Активация генов 58, 60
 — В-лимфоцитов 138—140
 Активный центр 3—5, 12
 — ассоциация с антигенной детерминантой 36
 — строение 19—27, 42
 Антиомии D 84
 — влияние на лимфоузлы 165
 Аллели, активность в лимфоцитах 130—131
 — множественные 207
 Аллельное исключение 7, 58, 95, 130—132
 Аллельные варианты 42—45, 51
 — детерминанты 130
 Аллоантигены, и сигналы от Т-лимфоцитов 182
 — при активации В-лимфоцитов 184
 Аллотипическая супрессия 148, 149, 187
 Аллотипические варианты (аллотипы) 5, 6, 11, 41, 42, 130
 — легких цепей 43
 — тяжелых цепей 50—57
 — детерминанты 43, 55
 Аллофетные мыши 111, 113
 Альбумин 136
 — сывороточный бычий 148, 168
 — человека 146, 147
 Альфа-глобулины 150
 Альфа-цепи 61
 Аминоацил-тРНК 76
 Аминокислотная последовательность 4, 11, 12, 60, 61
 Аминокислотные замены в активном центре 24
 — в антигенах 4, 206, 216
 — в антителах 5, 12, 50, 51
 — в ламбда-цепях 44, 45
 — в тяжелых цепях 53, 55, 57
 Аминокислоты, включение 68
 — транспорт 140
 Амплификация 62, 63, 86, 88
 Антигенезависимые предшественники, см. Клетки-предшественники
 Антигенные детерминанты 3, 5, 10, 13, 41, 133, 177 (см. также Аллотипические детерминанты, Идотипические детерминанты)
 — ассоциация с активным центром 30, 36
 — взаимодействие с рецепторами 181, 182, 185
 — в препаратах РНК 85
 — гамма-цепей 50, 51, 53
 — А-клеток 166
 — роль в активации В-лимфоцитов 138, 139
 — свойства иммуноглобулинов 41—43
 Антигенный фон 173
 Антигены 3, 13, 41, 59 (см. также Трансплантационные антигены)
 — взаимодействие с макрофагами 181, 182
 — влияние на А-клетки 167
 — конкуренция 187
 — митогенные свойства 181
 — Т-независимые 181
 — распределение в лимфоидных органах 163—165
 — роль в регуляции иммунных процессов 8, 128, 138—140, 160, 161, 166, 213
 — серологически определяемые 207—216
 — H₂ 161, 162
 — Ia 8, 184, 208
 — Ly 161, 162
 — TL 161, 162
 — Vi 177
 — θ 162, 188, 196
 Антитела 3, 159
 — авидность 164, 165
 — антиполисахаридные 30
 — генетический контроль 67, 87
 — меченые 6
 — натуральные 137
 — синтез 128—144, 164, 165, 181, 182
 — кривая 128—129
 — подавление и стимуляция 136, 142, 144—152
 — специфичность 164, 165
 — строение и функция 3—5, 10—37
 — экстрапептиды 81
 Антителогенез 128—152, 167
 — влияние Т-супрессоров 186
 — механизмы 167, 181, 198—200
 — роль клеточной кооперации 177—185
 Антителообразующие клетки (АОК) 6—8
 — в культурах 163—165, 174
 — дифференцировка 58, 59, 159, 160, 177
 — кооперация 193—200
 — метод выявления 128
 — ограничение 144—152

- пролиферация 142—144
- синтез антител 131, 132, 134, 135, 164, 165, 185
- — белков и РНК 84
- — число 128, 136, 145, 149, 180
- Аппендикс 162
- АТФаза 141
- ингибирование синтеза иммуноглобулинов 76
- Аутоантитела 42, 148, 187
- Безмикробные животные, антитела у них 137
- Белки 3, 15—17
 - гетерогенность 10
 - как антигены 13
 - миеломные 19, 63
 - синтез 60, 67
 - спии-меченые 32
 - физика 37
 - флуоресценция 14, 22, 23
 - Н-2 138, 139
- Белок нормальный иммуноподавляющий 150
- Бензоат спии-меченый 22
- Бентонит 69
- Бесклеточные системы, сборка иммуноглобулинов 89
 - трансляция мРНК 78—81
- Бестимусные мыши 182, 183, 187
 - культура клеток селезенки 185
- Биклональные миеломы 63
- Бласттрансформация в смешанных культурах 166
 - В-лимфоцитов 185
- Бурстобразующая единица (БОЕэ) 114—116
- Вандерваальсовы взаимодействия 21, 25
- Варибельная область 4, 5, 11—13, 18, 28, 42, 129, 130, 133
 - биклональных миелом 63
 - генетический контроль 48, 54—57, 82, 83
 - гибридных клеток 84
 - последовательность аминокислот 61, 83
 - при «болезни» тяжелых цепей 60
- Взаимодействия клеток, см. Кооперация клеток, Межклеточные взаимодействия, Микроокружение
- Виблация 189
- Вирусы и тканевая совместимость 213, 214
- Водородно-дейтериевый обмен 14, 18, 30
- Водородные связи 25
- Время корреляции молекул 25—28
- Вторичная и третичная структуры иммуноглобулинов 3—19
 - — — мРНК 82
- Выживание лимфоцитов в культуре 167
- Гамма-глобулины 3
 - лошади 146, 147
 - птиц 183
 - человека 149
- Гамма-цепи, последовательность аминокислот 61
 - структура 91
- Гаплотип 207, 208
- Гаптены 3, 32
 - бивалентные 21
 - витаминаи К₁—ОН 17, 19
 - гомологичные 22, 23
 - 2, 4-динитрофенол (ДНФ) 20—24, 27, 35, 136, 137, 145, 149, 216
 - динитрофторбензол 216
 - и механизмы цитотоксической реакции 216
 - как антигены 178
 - кооперация с неиммуногенным носителем 183
 - спии-меченые 22—24, 26
 - структура 19—21
 - флуоресценция 34
- Гемолизинпродуцирующие клетки 166
- Гемолитический комплемент 210
- Генетические карты 207—209
- Генетический код 61
- Гены, см. Главный комплекс, Сцепление
 - аллотипов 130
 - гистосовместимости 166—168
 - иммуноглобулинов 5—7, 41—63, 67, 85—89, 94, 95
 - внедрение нуклеотидов 85
 - легких цепей 43—49, 58—61
 - объединение 7, 48, 88
 - поэтапная экспрессия 173
 - тяжелых цепей 49—61
 - феотипическое ограничение 132—135
 - I 8, 138, 179
 - C 7, 43—46, 49—54, 85, 87, 88
 - Gm 52, 53
 - V 7, 46—49, 54—57, 80, 85—88, 133, 134, 168
 - VC 54, 56, 60—63, 83, 88
- Гепарин как ингибитор РНКаз 69, 70
- Гетеротопная трансплантация 162, 163, 169
- Гибкость молекул иммуноглобулинов 25, 27—29
- Гибридизация РНК и ДНК 86—88
- Гидрофобные взаимодействия 21, 22, 24
- Гиперварибельные области 12, 16, 17, 19, 25
 - активного центра 20, 24
 - тяжелых цепей 55, 57
- Гистамин 29
- Гистиоциты, происхождение 108
- Гистогенез кроветворной ткани 108, 114—120
 - лимфоидной ткани 159, 161
- Гистосовместимость, см. Главный комплекс — антигены 178
- Главный комплекс (генов тканевой совместимости) 8, 207—216
 - гемолизининдуцирующих клеток 166
 - контроль клеточной кооперации 179
 - макрофагов и Т-клеток 167, 178
- Гликопротеиды 8, 10, 208
- Головастики жабы, синтез антител 137

- Гомогенизация тканей 69
 Гормоны, влияние на лимфоциты 140, 141
 Гранулопоз 115, 116
 Гуанидинхлорид 35
 Гуанилциклаза 141
 Гуморальные ингибиторы 144—152
 — факторы 8, 190—193, 198—200
- Двусигнальная теория 138, 139, 181—183
 Двухъядерные клетки 140
 α -1,3-декстран 56
 Детерминация дифференцировки 135—137, 159
 2,4-динитрофенол (ДНФ) 20—24, 27, 35, 136, 137, 145, 149, 216
 Дисперсия оптического вращения 14, 18, 36
 Дисульфидные (S—S) связи в иммуноглобулинах 11, 13, 18, 28, 29
 — восстановление 32
 — при сборке молекул 89
 — IgA 52, 53, 90
 Дифференцировка клеток 3, 9
 — антителообразующих 58, 163—165, 173, 174
 — иммунокомпетентных 3, 7, 8, 139, 141, 159, 168, 173, 180, 182, 185
 — и образование антител 67
 — стволовых 102, 108—124
 — T 161, 162
 — транслокация 62
 Диффузионные камеры 169
 ДНК, биосинтез 185
 — влияние фактора 192
 — циклических монофосфатов 142, 152, 167, 183
 — в продуктивный период 197
 — комплементарная 86, 87
 — при иммунизации 67, 166
 — транслокация и интеграция 60, 61
 ДНКазы, влияние на фактор Т-лимфоцитов 178, 190
 ДНФ, см. 2,4-динитрофенол
 Додецилсульфат натрия 35
 Домены 4, 13, 14, 129
 — броуновское движение 34
 — перемещение 28
 — стабилизация 34, 35
 — структура 16—19, 24, 25
 — IgG 33
 Дупликация генов 53
- Желатина 136
 Желточный мешок 111—113
- Закон Стока — Эйштейна 15, 16, 27
 Заселение лимфоидных органов 160—163
 — трансплантатов 169
- Идиотипические варианты (идиотипы) 11, 12, 41—42, 133
 — наследование 54
 — детерминанты 56
 Изотипические варианты (изотипы) 11, 41
 — легких цепей 44
 — Kern, Oz 17, 44
 — Mcg 44
 Изотопы, меченные антигенами 164
 Изозлектрическая точка иммуноглобулинов 35
 Иммуний ответ, гуморальный 176—200
 — продуктивная фаза 197—200
 Иммуногены 8, 128
 Иммуноглобулины 3, 4, 128—130 (см. также Сборка иммуноглобулинов, Секретция иммуноглобулинов)
 — биосинтез 57, 58, 60, 67—96, 132—133, 142, 149, 164—166
 — миеломные 63, 71, 79—81, 90
 — «патологические» 4, 10, 11
 — регенерация 132
 — строение и функция 3—5, 10—37, 41, 90, 91
 — число 129
 — IgA 10, 13, 19, 21, 23, 24, 27, 52—54, 63, 81, 89—91, 93, 133
 — взаимодействие с ДНФ 35
 — IgD 10, 53, 54, 90, 91, 93, 132, 133
 — IgG 10, 63, 81, 89—91, 94, 132, 133, 147, 149, 165, 166
 — аллотипические маркеры 50
 — гены 50—54
 — гибкость молекул 27—29
 — комплекс с гаптеном 26, 36
 — связывание компонента 32
 — спектры ЭПР 33
 — IgE 10, 27—29
 — варианты 53, 54
 — IgM 10, 13, 25, 26, 63, 89, 91, 93, 133, 164—166
 — варианты 53, 54
 — стабилизация 35
 — IgT 181, 182
 Иммунокомпетентные клетки, см. Антителообразующие клетки
 Иммунология, методы 6
 Иммунорегуляторный альфа-глобулин 150
 Иммуносорбенты 136, 146
 Ингибиторы РНКазы 69
 Индекс вариабельности 12
 Индукция иммунной реакции 138
 Инициация антителообразования 193
 — синтеза иммуноглобулинов 76
 Информационная РНК, см. матричная РНК
 Инфракрасная спектроскопия 18
 Ионы, транспорт 140
- Каппа-цепи (κ -цепи), варианты 42, 43, 45
 — генетический контроль 57—59
 — сцепление генов 48
 Каркасные остатки 16, 17
 Квантовый выход 22, 23
 Т-киллеры 8, 176
 Кислая фосфатаза 170
 Кластерфильное взаимодействие 36
 Клетки, см. Клетки-предшественники, Лимфоциты, Плазматические клетки, Ретикулярные клетки, Стволовая кроветворная клетка, Стромальные механоциты, Фибробласты

- А 8, 179
- влияние на лимфоциты 138, 165—169
- деидрические 168
- источники 121
- костного мозга 159, 160 (см. также Стволовая кроветворная клетка)
- органическая специализация 173
- памяти 147
- перитонеального экссудата 166, 169
- селезенки 165
- способные к образованию колоний 104 (см. также Колониеобразующие клетки)
- стромальные 122, 160, 161
- репопуляция 161—163
- 0 118, 119
- Клетки-предшественники, см. Стволовая кроветворная клетка
- дифференцировка и потенции 102, 159, 160
- инактивация 178
- и синтез антител 137, 180
- кроветворных, лимфодных и стромальных клеток 108, 113—120, 170—172
- Клеточные контакты 122, 166, 167
- мембраны 93, 208 (см. также Мембранные иммуноглобулины)
- — активация лимфоцитов 138—141
- — локализация антигенов 164
- — макрофага 180
- — проницаемость 122
- — роль в синтезе иммуноглобулинов 74—76
- — в секретируемых иммуноглобулинах 88, 91—95
- Клеточный иммунитет 6
- Клональная теория 4, 7, 130, 135
- — и активность генов 58, 59
- Клонирование клеток 102—104, 108—111, 170
- Клоногенные предшественники 169—172
- КОЕК, см. Колониеобразующая единица
- КОЕС, см. Колониеобразующая единица
- КОЕТэ, см. Колониеобразующая единица
- КОКФ, см. Колонии фибробластов
- Коллаген 171—173
- Коллагеназа 136
- Колониеобразующая единица в культуре (КОЕК) 115, 116
- — селезенки (КОЕС) 103
- — свойства 104, 106, 107, 114
- — эмбриогенез 111, 112
- — эндогенных колоний (КОЕТэ) 114, 116
- Колониеобразующие клетки 170, 171
- Колонистимулирующая активность 115, 116
- Колонии фибробластов (КОКФ) 103, 169—172
- Колонизация 143
- Коммитирование Т-лимфоцитов 113, 161
- Комплексы 22, 23
- агрегация 32
- антиген — антитело 11, 19, 25, 29—31, 33, 36, 118, 168, 184, 185
- антиген — IgT 181
- антитело — гаптен 21, 22, 25, 26
- антитело — флагеллы 25, 26
- ДНФ — метилен 24
- метилированный сывороточный альбумин — L-глутаминовая кислота 148
- РНК — антиген 179
- ТНФ — эритроциты 134
- фермент — ингибитор 36
- Комплемент 6
- С3-компонент 138, 139, 179
- связывание 11, 29, 32
- Конковалин А 149, 167
- Константа ассоциации 36
- Контактное торможение 151
- Конформационные изменения антител 29—34
- Конформеры 34, 35
- Кооперация клеток 176—200, 213
- — влияние полиаионов 183
- — генетический контроль 179
- — иммунокомпетентных и макрофагов 165—167, 174
- — роль в регуляции кроветворения 122, 124
- Кортисон 161, 162
- Кортикостерониды 187
- Костный мозг, клеточный состав 102, 105, 109, 161, 170
- — культивирование 169
- — стимуляция антителообразования 176
- Кривые антителообразования 128, 129
- Кроветворение 120
- Кроветворная система, отделы 120
- Кроветворные клетки, дифференцировка 102, 120—124 (см. также Гранулопоэз, Лимфопоэз, Эритропоэз)
- — компетенция 108
- — происхождение 110
- — трансплантация 102—104
- — эмбриогенез 111—113
- Кроссринговер внутритрансакционный 60
- — генов тяжелых цепей 54
- Круговая поляризация флуоресценции 14, 32, 34
- Круговой дихроизм 32, 36
- Культуры клеток, см. Смешанная культура
- — агаровые 165
- — выживание 167
- — кроветворных тканей 108, 114, 169, 194, 195
- — монослойные 168—171
- — органичные 113
- — плотность 151, 152, 167
- — селезенки 185, 188, 189
- — толерантных 186
- β-Лактозид 136
- Ламбда-цепи, варианты 44, 45
- генетический контроль 57—59
- сцепление генов 48
- Лантаниды 21
- Леван 181
- Легкие цепи (L-цепи) 4, 5, 11—13, 20, 28, 30, 32, 33
- — генетический контроль 43—49, 60, 71

- миеломных иммуноглобулинов 63, 68
- полиморфизм 44—46
- последовательность аминокислот 60, 61
- сборка 89—91
- синтез 72—76
- Лейцины в IgG 51
- N 71, 75
- Лиганды 17, 22—24
- гексасахаридные 32
- связывание 36
- Лизосомы 170
- Лизоцим 30, 137
- Лимфатические клетки 9
- Лимфобласты 140
- Лимфоидные органы 159—174
- Лимфомы 71
- Лимфоузлы, гистогенез 161
- колонии фибробластов 169, 171
- микросомы 69
- мРНК 84
- полирибосомы 70, 71
- распределение антигенов 163—165
- синтез иммуноглобулинов 71—75
- Лимфоциты, аллельное исключение 130—132
- в смешанной культуре 166, 194—196, 207, 215, 216
- дифференцировка 3, 7, 8, 29 (см. также Лимфопоз)
- малые 161—163
- миграция 8, 161—163
- типы 140, 161
- В-лимфоциты (В-клетки) 6, 135—137, 176
- активация 138—140, 181, 182
- взаимодействие с Т-лимфоцитами 184, 185
- дифференцировка 117—120, 159, 161—164, 173, 174, 177, 183
- миграция 161—163
- митотический цикл 143
- радиочувствительность 165
- рецепторы 164, 181
- связывание антигена 181, 208, 213
- супрессоры 191, 192
- Т-лимфоциты (Т-клетки) 6, 176
- антигенспецифические 138, 139
- взаимодействие с В-лимфоцитами 184, 185
- с макрофагами 167
- локализация 188
- помощники 189 (см. также Т-хелперы)
- радиочувствительность 165
- рецепторы 159, 212
- роль в иммунитете 148—150, 181, 182
- в образовании антител 148
- состав популяции 188, 189
- Липиды 3
- Липополисахариды 167
- бактериальные 177, 183
- Липосомальные протеазы 139
- «Липофильный хвост» 138, 139
- Локальный гемолиз 128, 131, 140, 194, 195
- Макалоид 69
- Макромолекулы 3
- Макрофаги, взаимодействие с Т-лимфоцитами 166, 177
- влияние на активацию В-лимфоцитов 138
- в перитонеальном экссудате 172
- происхождение 108, 115, 116
- роль в иммунном процессе 8, 160, 163, 164, 177, 179, 180
- супрессорная функция 192, 193
- тимуса 162
- Маленинмид 32
- Малоугловое рентгеновское рассеяние 14, 30, 34
- Маркеры, см. Не-маркеры
- аллотипические 50, 51
- антигенные 163
- генетические 42
- гамма-цепей 53, 54
- Т-лимфоцитов 161
- радиоактивные изотопы 164
- хромосомные 103, 105, 108, 109, 159, 160, 163, 169, 177
- InV 43
- Матричная РНК (мРНК), время жизни 74, 84, 85
- выделение 77, 78
- гибридизация с ДНК 86, 87
- легких цепей 60, 79, 82, 86—88, 95
- полирибосом 71
- синтез иммуноглобулинов 7, 75, 84—87, 94, 179
- структура 73, 76, 81—84
- трансляция 48, 78—82
- транспорт 76
- тяжелых цепей 79, 86, 88, 95
- Медиаторы Т-лимфоцитов 148, 178, 180, 185, 189, 190, 198
- влияние на В-лимфоциты 138, 178
- Межклеточные взаимодействия, см. Кооперация клеток, Микроокружение
- лимфоцитов 166—167, 188—189
- роль в иммунном ответе 8, 151, 152
- Мембранные иммуноглобулины 93—95
- 2-меркаптоэтанол 32, 167
- Метилгуаозин 82
- Метноин, замены 53
- функция инициатора 49
- экстрапептидов 80
- Метка, см. Маркеры
- Методы выделения мРНК 77, 78
- генетические 43
- гибридизации ДНК с РНК 86—88
- изучения стволовых клеток 102—104
- строения иммуноглобулина 13—16, 20—26, 28, 30, 32, 34, 36
- иммуногистохимические 69
- иммунологические 128
- иммуофлуоресцентный 131
- иммуохимический 128
- локального гемолиза 128
- перекрестной реактивности 22—25, 42
- электроно-микроскопический 69
- Механоциты 160, 169, 172

Миграция клеток костного мозга 200

- лимфоидных тканей 159, 173, 174, 200
- стволовых 105
- тимоцитов 188

Миелома биклональная 63

- мРНК 77, 84
- полирибосомы 71
- синтез иммуноглобулинов 71, 75

Миелопоз 116**β₂-Микроглобулин 208**

- Микроокружение иммунокомпетентных клеток 159—174
- спинной метки 15, 33
- стволовых клеток 107, 110, 112, 116, 118, 119, 121, 22

Микросомы, роль в синтезе иммуноглобулинов 74—76, 79**Митогены, активация лимфоцитов 138—141, 167, 183, 185**

- неспецифические 178, 181

Митоз 143**Митотическая активность в лимфоидных органах 161****Митотический цикл антителообразующих клеток 142, 143, 164**

- колониеобразующих клеток 170
- стволовых клеток 106

Модели активации В-лимфоцитов 138, 139

- активности белка 24
- биосинтеза белка 67—69
- взаимодействия лимфоцитов и макрофагов 180—185
- иммуноглобулинов 17, 19
- конформерная модель 34
- кооперации клеток 184, 185
- кроветворения 123
- объединения генов 60, 61
- транслокона 58
- Fab-фрагментов 19

Моноциты, дифференцировка 108**Морфин 24****Мультипотентность (полнотентность) антителообразующих клеток 134**

- стволовых кроветворных клеток 108

Мутация H-2-комплекса 210—212, 216

- миеломных клеток 60
- соматические 85, 87
- стволовых клеток 106

Мышьяная лимфома 142**Мы-цепи 61, 91****Не-маркеры 51, 52, 55****Нуклеазы 69****Нуклеотиды, внедрение в гены 85****Обратная трансплантация 169****Односигнальная теория 138, 139, 181, 182****Оксимочевина 142****4-окс-3-нитрофенилуксусная кислота 133****Олигосахариды 30****Оциты лягушки 60, 79, 84****Опухоль 187****Органная специализация клеток 173, 174****Остеогенез 169, 170****«Палиндромы» 61, 62****ПАОК, см. Предшественники антителообразующих клеток****Папани 71****Парабонты 170****Парантрофенол 23****Пейеровы бляшки 105, 162****Пенициллин, антитела к нему 137****Пепсин 166****Пептидил-тРНК 76****Первичный иммунный ответ 22****Переключение активности генов 63, 96****— биосинтеза иммуноглобулинов 67, 94****Перекрытая реактивность антител 22—25, 42****Плазматические клетки 140, 144****— дифференцировка 161, 164, 165, 173, 174****— рецепторы 93****— синтез антител 180****— опухоли (плазматомы) 68—70, 73****— рецепторы 93****— синтез легких цепей 77, 79****Плазмобласты 140****— дифференцировка 164, 165, 173, 174****— мРНК 84****Плазматомы, см. Плазматические опухоли****Плак 6****Плотность клеток в культурах 151, 152, 167, 170****Поворотная симметрия 61, 62****Полиакриламидные камеры 143, 144****Полналанин-полилизинполипептиды как антигены 30****Полнамфолты, влияние на кооперацию клеток 183****Полнаноны 182, 183****Полноклональная стимуляция 167, 181****Полнмеры синтетические 182****Полнморфизм антигенов 50, 207, 213****— иммуноглобулинов 129, 130****— легких цепей 44, 45****— тяжелых цепей 55****Полнпептидные цепи 4, 10, 11 (см. также**

Альфа-цепи, Варнабельные области, Гамма-цепи, Каппа-цепи, Легкие цепи, Мю-цепи, Постоянные области, Тяжелые цепи, Фрагменты)

— антигенная специфичность 44, 45**— гибридные 48****— образование 68****— при «болезни» тяжелых цепей 60****— структура 10—13****Полирибосомы, выделение 69—71, 77****— секрция иммуноглобулинов 91****— синтез иммуноглобулинов 73—76, 82, 89****Полнсахариды 3****— как антигены 13, 19, 31****— SSSIII 149, 177****Полярзация флуоресценции 25, 26, 28—30****Последовательность аминокислот 4, 11, 61, 80, 83****Постоянная область 4, 5, 11—13, 17, 18, 28, 42, 129, 130, 133**

- генетический контроль 43, 49—54, 82, 83
- гибридных клеток 84
- миеломных иммуноглобулинов 63
- полиморфизм 45, 46
- последовательность аминокислот 61, 83
- при «болезни» тяжелых цепей 60
- Предшественники антителообразующих клеток (ПАОК), 7, 8
- дифференцировка 159, 160
- исходная популяция 135—137
- рецепторы 138—139
- механоциты 169—172
- Преципитация 29
- Продуктивная фаза 196—200
- Пролиферация 67
- антителообразующих клеток 142, 144—152
- лимфоцитов 161, 185, 197
- предшественников антителообразующих клеток 160, 162, 189
- стволовых клеток 102—108, 120—123
- фибробластов в культуре 171
- Протеазы 11
- влияние на фактор Т-лимфоцитов 178
- митогенное действие 139
- Протеникиназа 142
- Радиоактивное «убийство» 136
- Радиорезистентность А-клеток 165, 179
- Радиохимеры, см. Химеры
- Радиочувствительность клеток лимфоузлов 165
- предшественников 171
- стволовых 112
- А 165, 179
- Т 187
- Радиус гирации 30
- Стокса 14, 16, 26
- Распознавание 162—165, 179, 180
- Реакция в смешанной культуре лимфоцитов 166, 194—197, 207, 215, 216
- замедленной повышенной чувствительности 166, 167
- клеточного иммунитета 8, 208—216
- Реакция агглютинации 29
- «трансплантат против хозяина» 117, 207, 215, 216
- Регенерация иммуноглобулинов 131
- Рентгенокристаллографический анализ 29
- Рентгеноструктурный анализ 14, 18, 25, 28
- Репрессия генов 58, 60
- Рестриктазы 61, 62
- Ретикулярные клетки (ретикулоциты) 162, 164, 169
- Рецепторы иммуноглобулиновые 93, 132, 168
- В-лимфоцитов 140, 164, 177, 181, 185
- Т-лимфоцитов 8, 138, 139, 159, 177, 187
- макрофагов 179, 180, 182
- предшественников антителообразующих клеток 138, 139
- Fc 184, 185
- Рециркуляция лимфоцитов 162, 173, 174
- Рибосомы 161, 162
- роль в синтезе иммуноглобулинов 75, 76
- РНК, см. аминокислот-тРНК, матричная РНК, пептидил-РНК
- влияние на макрофаги 180
- комплекс с антигеном 179
- синтез 67, 163
- тРНК 76
- РНКаза, влияние на полирибосомы 69—70, 76
- на фактор Т-лимфоцитов 178
- как антиген 30, 31
- Ряд Гоффмейстера 35
- Самоподдержание стволовых кроветворных клеток 103, 105—108
- Сборка молекул иммуноглобулинов 89—91, 130
- Секреция иммуноглобулинов 89, 91—93
- Селезенка, гистогенез 161
- клеточный состав 165, 166, 179, 187
- культивирование 168, 169
- синтез легких цепей 73
- стволовые кроветворные клетки 102—104
- Серологически определенные антигены 207—216
- Сигналы в иммунокомпетентных клетках 138, 139, 176, 181
- Смешанные культуры лимфоидных клеток 166, 194—197, 207, 215, 216
- схема культивирования 195
- Совместимость тканевая, см. Тканевая совместимость
- Спаянные гаптены 20—24, 26
- Спайная метка 14—16, 19, 22—24, 26
- и взаимодействие доменов 32, 33
- Старение стволовых клеток 106, 107, 113
- Стволовая кроветворная клетка 102—124, 159, 160, 161, 170
- Стрептококк 56
- Стромальные механоциты 160, 168
- клеточные линии 169—172
- органная специфичность 173, 174
- Суперантиген 167
- Супрессоры 148, 208
- влияние на антителообразование 148—150
- Сцепление генов легких цепей 48, 49
- тяжелых цепей 51, 54—57
- Сывороточные белки 3
- Температура, влияние на конформеры 35
- Теофиллин 142
- Термодинамика 23
- Тетрааланин 30
- Тимидин, включение 68, 197
- влияние протеаз 139
- влияние на пролиферацию 185
- Тимозин 162, 198
- Тимоциты 162, 166
- влияние на конкуренцию антигенов 187
- генетический контроль 48
- кортизончувствительные 187

- супрессорные свойства 188
- Тимус, гистогенез 161
 - заселение лимфоцитами 161—163
 - культивирование и трансплантация 169
- Тимусзависимые зоны лимфоузла 164, 181, 186
- Тимуснезависимые лимфоциты 181, 186
- Тирозин 19
- Тканевая совместимость, главный комплекс 207—216
- ТНФ, см. 2, 4, 6-тринитрофенол
- Токсин холеры 142
- Толерантность 3, 29, 182
 - влияние Т-супрессоров 148, 186, 187
 - индукция сигналом 183
- Транскрипция VC-гена 62, 88
- Транслокации ДНК 58, 60—63
- Транслоконы 58—63
- Трансляция 48, 78—82, 88
- Трансплантат, см. Реакция «трансплантат против хозяина»
 - отторжение 212
- Трансплантационные антигены 8, 9, 161, 178, 207—216
- Трансплантация гетеротопная 162, 163, 169, 170
 - кровеносных клеток 103
- Трансфераза 76
- Трансформация лимфоцитов 131
- Треонин, замены 53
- Третичная и вторичная структуры иммуноглобулинов 13—19
- 2, 4, 6-тринитрофенол (ТНФ) 22, 134, 137, 213
- Трипсин, митогенное действие 139
- Тритон-Х 70
- Тучные клетки 29
- Тяжелые цепи 4, 5, 11—13, 20, 130
 - генетический контроль 49—57, 71
 - миеломных иммуноглобулинов 63, 71, 74
 - плазмочном 68
 - последовательность аминокислот 60, 61
 - сборка 89—91
 - синтез 71—76
- Углеводы в иммуноглобулинах 91—93
 - транспорт 140
- Уравнение Эйринга 36
- Урдин, включение 68, 77
- Фабрициева сумка, гистогенез 161
- Фагоцитоз А-клетками 167
- Фактор Т-клеток, см. Медиаторы
 - пролиферации 121
- Факторы гуморальные 190—193
 - индукции синтеза антител 198—200
 - торможения 144—152
 - фениларсонат 56
- Фенотипическое ограничение 7, 129—135
- Фермент гликолизирования 76
 - отщепления экстрацеллюлярного 49, 81
- Фибробласты 169—172, 174
- Флагеллин 136
- Фооновые клетки 137
- Фосфодиэстеразы 141
- Фосфорилхолин 17, 19, 21, 56
- Фрагменты 11, 13, 17—19, 25—32, 34—36, 90, 91, 147, 179
 - рецепторы 118
 - синтез 71—73
 - Fv 21, 27
- Хелперная функция 208
- Т-хелперы (Т-клетки-помощники, Т-лимфоциты-помощники) 8, 9, 176, 180
 - в культурах 167
 - дифференцировка 167
 - локализация 148
 - фактор 138
 - функция 177—179, 185, 189
 - — влияние Т-супрессоров 187
- Хемотропизм 35, 166
- Химеры радиационные 105, 215
 - — полицитетические 109
 - — тетрародительские 111
 - — эритроциты в них 113
- Хромосомные перестройки как маркеры 103, 109, 159, 160
- Хромосомы, локализация генов легких и тяжелых цепей 54, 55, 58, 59, 61
- Хромофоры 14, 36
- Циклический АМФ 140—143, 183
- Циклический ГМФ 140—142, 183
- Четвертичная структура иммуноглобулинов 34
- Щелочная фосфатаза 170
- Экстрануклеотиды 82
- Экстрапептиды 80, 81, 83
- Электронная микроскопия антителообразующих клеток 140
 - — иммуноглобулинов 25—27
 - — межклеточных контактов 166
- Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 16, 19, 22—24, 26, 34
 - — — спектры 15, 33
- Эмбриогенез стволовых клеток 107, 108, 111—113
- Эндоплазматический ретикулум 69, 74, 75, 89
- Эндотелий 163
- Эпителлий 161
- Эритроциты 113—116
- Эритроцитоз 114
- Эритроциты агглютинация 42
 - барана 118, 119, 135, 137, 140, 142, 145, 149, 150, 152, 177—180, 182, 183, 187, 188, 197
 - в эмбриогенезе 111, 112
 - курицы 152
 - осла 178, 185
 - химер 113
 - человека 42
- Ядерный магнитный резонанс 21, 22
- Ядро колониеобразующей клетки 171

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Введение</i>	3
<i>I. Структура иммуноглобулинов</i> (А. И. Кяйвярайнен, Р. С. Незлин)	10
I.1. Общее представление о строении антител	10
I.1.1. Классы иммуноглобулинов	10
I.1.2. Первичная структура пептидных цепей иммуноглобулинов	10
I.1.3. Способы организации молекул иммуноглобулинов	13
I.2. Вторичная и третичная структуры иммуноглобулинов	13
I.2.1. Методы изучения вторичной и третичной структур иммуноглобулинов	14
I.2.2. Структура доменов и субъединиц IgG	16
I.3. Строение активного центра	19
I.3.1. Жесткость и глубина активных центров антител	20
I.3.2. Различия в свойствах активных центров антител после первичного и вторичного иммунных ответов	22
I.3.3. Активные центры антител к заряженным гаптенам	22
I.3.4. Перекрестная реактивность антител	22
I.3.5. Практическое применение метода спин-меченых гаптеинов	24
I.4. Форма и гибкость молекул антител	25
I.4.1. Определение времени корреляции с помощью спиновых меток, локализованных в активных центрах антител	27
I.4.2. Сравнительное изучение гибкости иммуноглобулинов G и E методом нежестко связанных меток	27
I.5. Конформационные изменения молекулы антитела в результате реакции с антигеном	29
I.6. Возможный механизм взаимодействия антитела с антигеном	34
Литература	37

<i>II. Генетика иммуноглобулинов (О. В. Рохли)</i>	41
II.1. Антигенные свойства иммуноглобулинов	41
II.2. Гены, контролирующие образование постоянной области легких цепей (C_L -гены)	43
II.3. Гены, контролирующие образование вариабельной области легких цепей (V_L -гены)	46
II.4. Гены, контролирующие образование постоянной области тяжелых цепей (C_H -гены)	49
II.5. Гены, контролирующие образование вариабельной области тяжелых цепей (V_H -гены)	54
II.6. Возможные схемы организации генетического материала, контролирующего биосинтез иммуноглобулинов	57
Литература	63
 <i>III. Молекулярные механизмы биосинтеза иммуноглобулинов (Е. В. Сидорова)</i>	67
III.1. Модельные системы, используемые для изучения биосинтеза иммуноглобулинов	67
III.2. Механизмы биосинтеза иммуноглобулинов. Роль полирибосом	69
III.2.1. Выделение полирибосом	69
III.2.2. Синтез тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов как единого целого. Время образования	71
III.2.3. Роль мембранного компонента в синтезе иммуноглобулинов	74
III.3. РНК, кодирующие синтез иммуноглобулинов	77
III.3.1. Выделение мРНК	77
III.3.2. Трансляция мРНК в бесклеточных системах	78
III.3.3. Структура и свойства мРНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов	81
III.3.4. Время жизни мРНК, кодирующих синтез иммуноглобулинов :	84
III.4. Индукция синтеза иммуноглобулинов под действием мРНК	84
III.5. Сколько генов участвует в синтезе иммуноглобулинов?	85
III.6. Сборка молекул иммуноглобулинов	89
III.7. Секреция иммуноглобулинов	91
III.8. Мембранные иммуноглобулины	93
III.9. О возможности одновременного синтеза разных иммуноглобулинов в одной клетке	95
Литература	96

<i>IV. Стволовая кроветворная клетка и ее дифференцировка в миелоидном и лимфоидном направлениях (И. Л. Чертов)</i>	102
IV.1. Свойства стволовой кроветворной клетки	102
IV.1.1. Метод изучения	102
IV.1.2. Миграция	105
IV.1.3. Самоподдержание	105
IV.1.4. Компетенция к различным дифференцировкам	108
IV.1.5. Эмбриогенез	111
IV.2. Дифференцировка стволовой кроветворной клетки	113
IV.2.1. Дифференцировка в эритроидном направлении	113
IV.2.2. Дифференцировка в гранулоцитарном направлении	115
IV.2.3. Дифференцировка в лимфоидном направлении	117
IV.3. Регуляция пролиферации и дифференцировки стволовых кроветворных клеток	120
IV.3.1. Регуляция пролиферации	121
IV.3.2. Регуляция дифференцировки	123
Литература	125
<i>V. Динамика антителообразования (А. Е. Гурвич)</i>	128
V.1. Кривая антителообразования	128
V.2. Фенотипическое ограничение активности генов	129
V.2.1. Аллельное исключение	130
V.2.2. Фенотипическое ограничение активности генов, контролирующих константную область тяжелых цепей	132
V.2.3. Фенотипическое ограничение V-генов	133
V.3. Исходная популяция предшественников антителообразующих клеток у иммунизированного животного	135
V.4. Активация В-лимфоцитов антигенами и митогенами	138
V.5. Изменение В-клеток после активации	140
V.6. Факторы, ограничивающие нарастание интенсивности биосинтеза антител и увеличение числа АОК	144
V.6.1. Истощение потенции к пролиферации изучаемого клона АОК	144
V.6.2. Торможение антителообразования присутствующими в среде антителами той же специфичности	146
V.6.3. Значение супрессорных Т- и В-лимфоцитов для развития фазы торможения антителообразования	148

V.6.4. Значение накопления гуморальных ингибиторов для фазы торможения антителообразования	150
V.6.5. Значение локальных взаимотормозящих межклеточных влияний для развития фазы торможения антителообразования	151
Литература	153
<i>VI. Микроокружение лимфоидных органов как фактор иммунитета (А. Я. Фриденштейн, Е. А. Лурия)</i>	<i>159</i>
VI.1. Репопуляция клеток-предшественников и заселение лимфоцитами лимфоидных органов	161
VI.2. Распределение антигенов во вторичных лимфоидных органах и дифференцировка антителопродуцирующих клеток	163
VI.3. Участие иелимфоидных А-клеток в иммунологическом ответе <i>in vitro</i>	165
VI.4. Клеточные линии стромальных механоцитов, переносящие микроокружение, и их клоногенные предшественники	169
Литература	174
<i>VII. Кооперация клеток при развитии гуморального иммунного ответа (Р. В. Петров, А. А. Михайлова)</i>	<i>176</i>
VII.1. Иницирующие кооперативные процессы	177
VII.1.1. Роль Т-клеток — помощников в индукции антителогенеза	177
VII.1.2. Роль макрофагов в индукции антителогенеза	179
VII.1.3. Модели взаимодействия Т- и В-лимфоцитов и макрофагов при индукции иммунного ответа	180
VII.2. Супрессирующие кооперативные процессы	186
VII.2.1. Т-клетки-супрессоры	186
VII.2.2. В-клетки-супрессоры	191
VII.2.3. Супрессорная функция макрофагов	192
VII.3. Кооперация клеток на уровне зрелых антителопродуцентов	193
VII.3.1. Гипотеза о двух этапах взаимодействия клеток в иммунном ответе	194
VII.3.2. Особенности кооперации	197
VII.3.3. Предполагаемые механизмы взаимодействия клеток в продуктивную фазу иммунного ответа	198
Литература	200
<i>VIII. Иммуногенетика главного комплекса генов тканевой совместимости (И. К. Егоров)</i>	<i>207</i>
Литература	217
Предметный указатель	220

ИММУНОГЕНЕЗ И КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Утверждено к печати
Научным советом по проблеме
«Закономерности
индивидуального развития животных
и управление процессами онтогенеза»
и Институтом биологии развития
им. Н. К. Кольцова

Редактор
Л. И. Вайсфельд
Редактор издательства
И. С. Левакина
Художник
Н. Н. Власик
Технический редактор
Ю. В. Рылина
Корректор
Ю. Л. Косорыгина

ИБ № 7466

Сдано в набор 22.03.78.
Подписано к печати 06.07.78.
Т-13018. Формат 70×100¹/₁₆.
Бумага типографская № 2.
Гвринтура литературная
Печать высокая
Усл. печ. л. 18,70. Уч.-изд. л. 19,1.
Тираж 1950 экз. Тип. зак. 4096.
Цена 2 р. 90 к.

Издательство «Наука»,
117485, Москва, В-485, Профсоюзная ул., 94а
2-я типография издательства «Наука»
121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

906-5712

ИЗДАТЕЛЬСТВО · НАУКА ·

Готовится к печати в серии «Проблемы биологии развития» книга Дыбана А. П., Баранова В. С. «Цитогенетика развития млекопитающих», 18 л.

В монографии рассматриваются механизмы возникновения в эмбриогенезе и гаметогенезе разных видов млекопитающих генетических и хромосомных aberrаций. Описываются способы направленного получения в эксперименте зародышей млекопитающих с гаплоидией, триплоидией, тетраплоидией, моносомией и трисомией определенных аутосом, с хромосомным мозаицизмом и генетическим химеризмом. Детально рассматривается влияние этих нарушений кариотипа на зародышевое развитие, а также на пре- и постнатальный периоды онтогенеза. Анализируется функция хромосом и действие генов в раннем развитии млекопитающих.

Рассчитана на широкий круг биологов, цитологов, эмбриологов, генетиков

Для получения книг почтой заказы просим направлять по адресу:

117464 Москва, В-464, Мичуринский проспект, 12, магазин «Книга — почтой» Центральной конторы «Академкнига»;
197110 Ленинград, П-110, Петрозаводская ул., 7 магазин «Книга — почтой» Северо-Западной конторы «Академкнига» или в ближайшие магазины «Академкнига».

Адреса магазинов «Академкнига»

- | | |
|---|--|
| 480391 Алма-Ата, ул. Фурманова, 91/97; | 630090 Новосибирск, Академгородок, Морской проспект, 22; |
| 370005 Баку, ул. Джапаридзе, 13; | 630076 Новосибирск, 91, Красный проспект, 61; |
| 320005 Днепропетровск, проспект Гайдари, 24; | 620151 Свердловск, ул. Мамина-Сибиряка, 137; |
| 734001 Душанбе, проспект Ленина, 95; | Ташкент, Ц-15, ул. 50 лет Узбекистана, 11; |
| 664033 Иркутск, 33, ул. Лермонтова, 303; | 700029 Ташкент, Л-29, ул. Ленина, 73; |
| 252030 Киев, ул. Ленина, 42; | 700100 Ташкент, ул. Шота Руставели, 43; |
| 277012 Кишинев, ул. Пушкина, 21; | 634050 Томск, наб. реки Ушайки, 18; |
| 443002 Куйбышев, проспект Ленина, 2; | 450075 Уфа, Коммунистическая ул., 49; |
| 192104 Ленинград, Д-120, Литейный проспект, 57; | 450075 Уфа, проспект Октября, 129; |
| 199164 Ленинград, Менделеевская линия, 1; | 720001 Фрунзе, бульвар Дзержинского, 42; |
| 199004 Ленинград, 9 линия, 16; | 310003 Харьков, Уфимский пер., 4/6. |
| 103009 Москва, ул. Горького, 8; | |
| 117312 Москва, ул. Вавилова, 55/7; | |

ИЗДАТЕЛЬСТВО · НАУКА ·
